

ESTUDIOS “IN VITRO” DE BIOMATERIALES DE COMPOSICIÓN EUTÉCTICA EN EL SISTEMA FOSFATO TRICÁLCICO-WOLLASTONITA

M. Magallanes-Perdomo, A.H. De Aza, R.G. Carrodeguas, S. De Aza, P. Pena

Instituto de Cerámica y Vidrio (CSIC). C/ Kelsen 5. Madrid-28049. España, mmagallanes@icv.csic.es

Resumen: En el presente trabajo se ha seleccionado la composición eutéctica del sistema fosfato tricálcico - wollastonita, obteniéndose un vidrio por fusión y colado; y un material vitrocerámico por desvitrificación controlada del vidrio en masa.

Ambos materiales se han caracterizado desde el punto de vista físico-químico y microestructural. La bioactividad se ha estudiado “in vitro” en suero fisiológico artificial (SFA) y en cultivos celulares. Los resultados indican que tanto el vidrio, como el vitrocerámico, presentan bioactividad en SFA y biocompatibilidad en cultivos celulares.

Palabras clave: apatita, wollastonita, suero fisiológico artificial, bioactividad, cultivos celulares, biocompatibilidad, biovidrios, vitrocerámicos.

1. INTRODUCCIÓN

Los biomateriales, naturales y sintéticos, se utilizan clínicamente desde hace años en la reconstrucción de estructuras anatómicas por estética o por razones terapéuticas en diferentes situaciones quirúrgicas [1]. Las cerámicas de fosfato de calcio se utilizan con éxito en cirugía traumatológica, dentaria y maxilofacial desde hace 30 años en la reparación de tejido óseo, debido a su biocompatibilidad, bioactividad y osteoconductividad [2]. En las últimas décadas, se han realizado importantes investigaciones con el fin de desarrollar nuevos materiales de fosfato de calcio dopado para mejorar su osteogénesis, velocidad de bioreabsorción y/o resistencia mecánica. El óxido de silicio en particular [3] ha recibido gran atención como elemento dopante en las cerámicas, vitrocerámicas y vidrios basados en fósforo. En estas investigaciones se ha encontrado que el óxido de silicio juega un papel importante en los procesos metabólicos que conducen a la formación de hueso endocondral e intramembranoso [4] y, junto con los óxidos de calcio, sodio y fósforo (como el 45S5 Bioglass®), actúa sobre la expresión de ciertos genes responsables del control del ciclo celular de los osteoblastos animales y humanos y estimula la osteoproducción [5].

De acuerdo con las anteriores consideraciones, materiales conteniendo silicio, fósforo y calcio son buenos candidatos para diseñar biocerámicas y vitrocerámicas con propiedades osteogénicas mejoradas. Con estos elementos se han diseñado diferentes materiales [1], por ejemplo De Aza y col. [6] han desarrollado una biocerámica densa policristalina (Bioeutético®). Esta cerámica contiene dos fases cristalinas, pseudowollastonita ($\text{CaSiO}_3 = \text{psW}$) y α -fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 = \alpha\text{-TCP}$). El Bioeutético® se obtiene mediante solidificación controlada del fundido de la composición eutéctica del

sistema binario wollastonita-fosfato tricálcico (W-TCP) (60 % peso wollastonita y 40 % peso fosfato tricálcico) [7]. La microestructura de este biocerámico está formada por colonias cuasi-esféricas con un tamaño medio de $20 \pm 5 \mu\text{m}$ formadas por cristales en forma de láminas alternadas de psW y $\alpha\text{-TCP}$ con una anchura media de 1,5 y 0,9 μm , respectivamente, y presenta una microestructura similar a la del hueso. Esta cerámica de composición eutéctica tiene la propiedad de reestructurar su morfología durante su inmersión en suero fisiológico artificial [8] o saliva de parótida humana [9], mediante la disolución de la fase psW y la subsecuente transformación pseudomórfica del $\alpha\text{-TCP}$ en hidroxiapatita (HA), por lo tanto es un material bioactivo con un gran potencial para una buena osteointegración.

Los procedimientos usados hasta el momento para obtener este material, enfriamiento controlado del fundido o crecimiento de la microestructura eutéctica en un horno de solidificación direccional por láser [6], limitan el tamaño y la forma de las piezas obtenidas, además son procesos de síntesis muy lentos y caros. Por otro lado, la porosidad interconectada generada, consecuencia del diámetro de las laminillas de psW disueltas, tiene un diámetro de poro demasiado pequeño ($\sim 1,5 \mu\text{m}$) para facilitar la vascularización del implante.

El presente trabajo aborda una investigación sobre la obtención de biomateriales de la misma composición química que el Bioeutético® (composición eutéctica del sistema W-TCP) pero mediante el proceso vitrocerámico, teniendo en cuenta que mediante esta técnica, en principio, es posible diseñar a medida el tamaño, la forma y la microestructura de los materiales que se obtengan dentro del sistema W-TCP. La tecnología vitrocerámica permite fabricar piezas grandes y con formas complejas de una forma económica mediante las técnicas habituales y bien

establecidas, del procesamiento de materiales vitrocerámicos (fusión, conformado en caliente y desvitrificación controlada) [10].

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

La composición eutéctica del sistema W-TCP [7] (60,0 % en peso de W- 40,0 % en peso de TCP) se ha preparado mediante la mezcla de CaCO_3 , SiO_2 y TCP en polvo. Las materias primas, las características de estas se pueden consultar en trabajos previos [11], se han mezclado rigurosamente en una túbula durante 2 horas. La mezcla obtenida se ha fundido en un crisol de Pt-Rh (90,0-10,0 % en peso) a 1600°C durante 30 min. El fundido se ha colado en una placa de latón. La pieza de vidrio obtenida se ha recocido a 795°C durante 19 min en un horno eléctrico.

Para obtener el vitrocerámico se realizó un tratamiento térmico al vidrio. Este ha sido establecido mediante un estudio previo [11] y consta de dos etapas; una a 820°C durante 2 horas y otra a 1100°C durante 1 h.

El vidrio y el vitrocerámico han sido caracterizados mediante fluorescencia de rayos X (FRX) y difracción de rayos X (DRX). Para el vitrocerámico se ha realizado un estudio mineralógico cuantitativo aplicando la metodología Rietveld [12].

Los estudios de bioactividad y la biocompatibilidad *in vitro*, de los materiales desarrollados en el presente trabajo, se realizaron en suero fisiológico artificial (SFA) y mediante cultivos celulares, respectivamente.

Para los estudios de bioactividad, se han sumergido probetas ($1,6 \times 5,7 \times 8,6 \text{ mm}^3$) de vidrio y vitrocerámico en SFA hasta 21 días a 36,5 °C. Para la presente investigación se ha elegido como formulación del SFA la propuesta por Kokubo y col. en 1991 [13]. Después de los días de estudio, las muestras fueron lavadas con agua destilada y acetona. La superficie de las muestras se recubrió con grafito para su estudio por microscopía electrónica de barrido (MEB-EDS), mientras que para el estudio de la evolución del espesor de la capa formada sobre la superficie; las probetas se cortaron transversalmente y se embutieron en una resina epoxi para su posterior pulido y observación mediante MEB-EDS. Para esta última etapa fue necesario recubrir las muestras con grafito.

Para el estudio de la biocompatibilidad se han realizado ensayos en cultivo celulares, de células MG63 (provenientes de un osteosarcoma humano) para el vidrio; y de células madre de médula ósea humana para el vitrocerámico, durante 3 días. Las células fueron sembradas sobre el material con una concentración de 5×10^4 células. Para cada tiempo estudiado se evaluó la adhesión, distribución y morfología celular, mediante MEB.

Antes de ser observadas al MEB, las muestras fueron preparadas adecuadamente con el procedimiento establecido con anterioridad [14].

3. RESULTADOS.

Los resultados de FRX del vidrio y del vitrocerámico indican que se mantiene la composición eutéctica de partida sin pérdida de elementos volátiles como el fósforo. Utilizando la composición de partida y la ecuación establecida por Stevels [15] se ha calculado el parámetro de conectividad del vidrio (parámetro Stevels ó Y) en 1,36.

El difractograma de rayos X del vidrio, presenta una curva difusa, típica de un material amorfo. De los resultados de DRX para el vitrocerámico y del análisis mediante la metodología Rietveld, se ha establecido que las fases presentes en el mismo son: apatita deficiente en calcio (44,8 % peso), wollastonita 2M (28,0 % peso) y fase amorfa residual (27,2 % peso). De los estudios Rietveld y del cálculo mediante análisis racional se ha encontrado que el parámetro Y para la fase amorfa es de 2,34.

En la Figura 1 se muestran los resultados por MEB de la superficie del vidrio después de los estudios en SFA a 3 y 21 días. Después de 3 días se puede observar una capa formada por agregados con morfología globular, que después de 21 días alcanzan un tamaño de ~200 nm, con una relación Ca/P cercana a 1,68 (resultados obtenidos mediante EDS); lo que sugiere que se trata de una apatita.

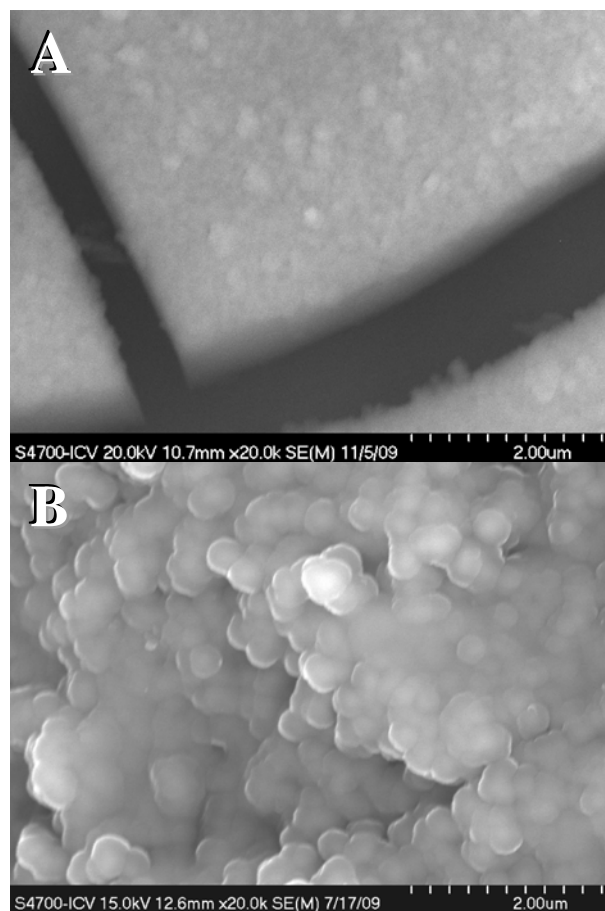


Figura 1. Micrografías obtenidas mediante MEB de la superficie del vidrio después de (A) 3 días y (B) 21 días.

A diferencia del vidrio, para el vitrocerámico después de 3 días en SFA no se observan agregados, sino una disolución preferente de fases (véase Figura 2). Después de 21 días de estudio se observan agregados con morfología pseudo-hexagonal con una relación Ca/P de 1,66.

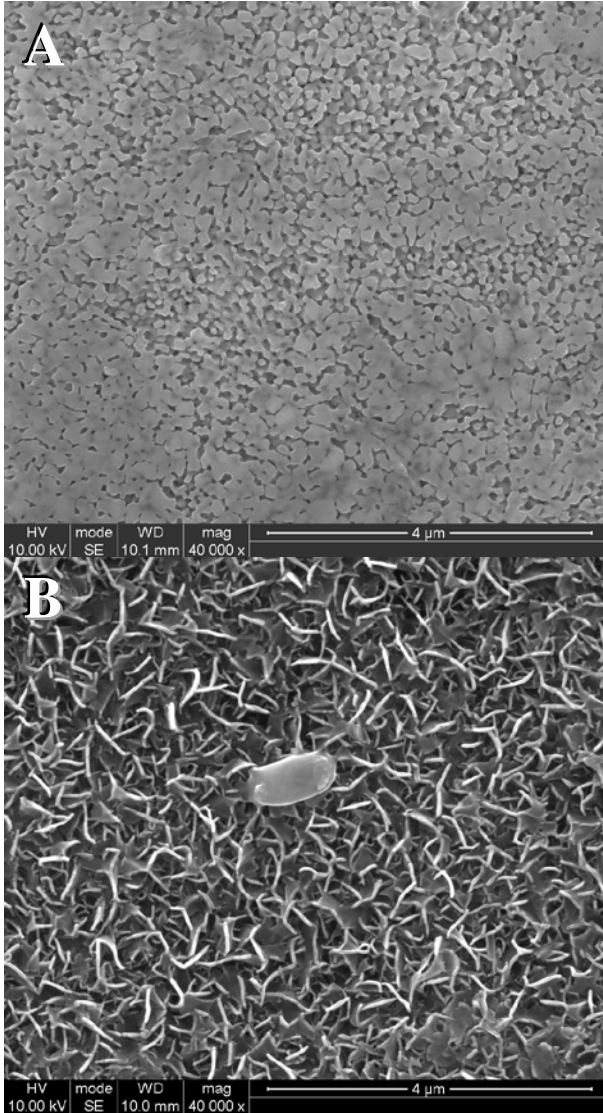


Figura 2. Micrografías obtenidas mediante MEB de la superficie del vitrocerámico después de (A) 3 días y (B) 21 días.

Los resultados del estudio de las secciones transversales de las muestras por MEB se muestran en la Figura 3. Es posible observar que para el vidrio la capa alcanza un espesor máximo (~ 28 μm) a los 14 días de estudio en SFA. Para el vitrocerámico el espesor máximo (~ 4 μm) se alcanza a los 21 días.

En las Figuras 4 y 5 se muestran la superficie del vidrio y del vitrocerámico, respectivamente, después de 3 días de cultivos celulares. Las células sembradas sobre el vidrio presentan una forma poligonal y están dispersas en toda la superficie de la muestra.

Las células sembradas sobre el vitrocerámico presentan una morfología alargada y no cubren la totalidad de la superficie de la muestra.

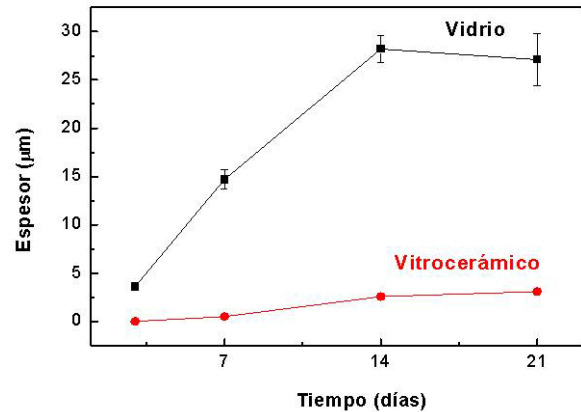


Figura 3. Evolución del espesor de la capa formada sobre la superficie de las muestras con el tiempo de inmersión en SFA.

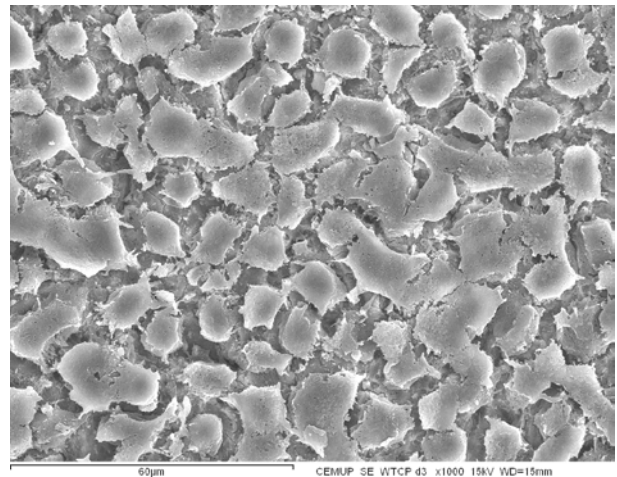


Figura 4. Micrografías obtenidas mediante MEB de la superficie del vidrio después de 3 días de cultivo con células MG63.

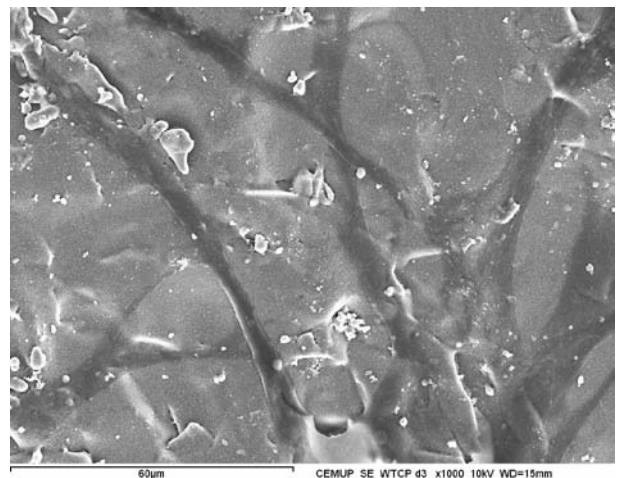


Figura 5. Micrografías obtenidas mediante MEB de la superficie del vitrocerámico después de 3 días de cultivo con células madre de médula ósea humana.

4. DISCUSIÓN.

El parámetro de Stevels de la fase amorfa del vitrocerámico es mayor que el del vidrio original, ya que al cristalizar la fase apatita deficiente en calcio (Ap dCa) aumenta el contenido de silicio en la fase amorfa residual. De todas formas, el valor de Y para ambos materiales es menor de 3,16 por lo que presenta posibilidades de ser bioactivo [15]. Esta característica se ha confirmado mediante ensayos en SFA, observándose al final del período de estudio (21 días) la formación de una capa con una relación Ca/P cercana al de la apatita.

Se han observado marcadas diferencias entre los resultados en SFA para los dos materiales estudiados. El vidrio después 3 días en SFA presentaba sobre su superficie la capa rica en Ca y P, mientras que para este mismo tiempo de estudio el vitrocerámico presentaba una disolución preferencial de las fases más solubles, que al pH y la temperatura del SFA; son la wollastonita 2M y la fase amorfa residual. El espesor de la capa al final del estudio (21 días) es significativamente mayor para el vidrio que para el vitrocerámico.

Las diferencias antes mencionadas se deben a la alta reactividad del vidrio en SFA; mientras que el vitrocerámico al presentar en su composición Ap dCa (fase mayoritaria en este material) lo hace menos reactivo, ya que es una fase estable al pH y temperatura de estudio.

Por otro lado, las diferencias mostradas en los resultados para los cultivos celulares para los dos materiales pueden explicarse por la diferencia de las células usadas y/o por la reactividad del material.

Diferentes estudios han demostrado [16] que la formación de una capa de apatita o capa rica en Ca y P favorece la adhesión celular. Por lo tanto, el vidrio al formar fácilmente esta capa a los 3 días de estudio presentará mayor adhesión y proliferación celular.

5. CONCLUSIONES.

Los materiales desarrollados en la presente investigación son bioactivos, formando una capa de apatita después de 21 días en SFA. Igualmente, mediante cultivos celulares se estableció que son biocompatibles.

La microestructura y mineralogía presentada por el vidrio y el vitrocerámico condicionan su reactividad y por lo tanto su comportamiento *in vitro*.

6. REFERENCIAS.

[1] Best S. M., Porter A. E., Thian E. S., Huan J., "Bioceramics: past, present and for the future", J Eur Ceram Soc 2008;28:1319-1327.
[2] Williams D. F., "On the nature of biomaterials", Biomaterials 2009;30:5897-5909.

[3] Dorozhkin S. V., "In vitro mineralization of silicon containing calcium phosphate bioceramics", J Am Ceram Soc 2007; 90:244-249.
[4] Carlisle E. M., "A silicon requirement for normal skull formation", J Nutr 1980; 110:352-359.
[5] Hench L. L., "Glass and genes: The 2001 W. E. S. Turner Memorial Lecture," Glass Technology 2003; 44:1-10.
[6] De Aza P. N., Guitián F., De Aza S., "Bioeutectic: a new ceramic material for human bone replacement". Biomaterials 1997;18:1285-91.
[7] De Aza P. N., Guitián F., De Aza S., "Phase-Diagram of Wollastonite-Tricalcium Phosphate", J Am Ceram Soc 1995;78:1653-1656.
[8] De Aza P. N., Guitián F., De Aza S., "A new bioactive material which transforms in situ into hydroxyapatite," Acta Materialia 1998;46:2541-2549.
[9] De Aza P. N., Luklinska Z. B., Anseau M. R., Hector M., Guitián F., De Aza S., "Reactivity of a wollastonite-tricalcium phosphate Bioeutectic (R) ceramic in human parotid saliva," Biomaterials 2000; 21:1735-1741.
[10] Vogel W., "Structure and crystallization of glasses," Leipzig, Germany: Pergamon Press, 1971, p. 246.
[11] Magallanes-Perdomo M., Pena P., De Aza P. N., Carrodegua R. G., Rodríguez M. A., Turrillas X., De Aza S., De Aza A. H., "Devitrification studies of wollastonite-tricalcium phosphate eutectic glass", Acta Biomater 2009;5:3057-3066.
[12] Young RA. "The Rietveld Method". Oxford University Press, 1993.
[13] Kokubo T., Takadama H., "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?", Biomaterials 2006;27:2907-2915.
[14] Magallanes-Perdomo M., Mateus A. Y., De Aza A. H., Teixeira S., Monteiro F. J., De Aza S., Pena P., "In vitro study of the proliferation and growth of human bone marrow cells on Apatite-Wollastonite 2M glass-ceramics". Acta Biomater. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.12.027>).
[15] Strnad Z., "Role of the Glass Phase in Bioactive Glass-Ceramics," Biomaterials 1992;13:317-321.
[16] Mateus A. Y. P., Barrias C. C., Ribeiro C., Ferraz M. P., Monteiro F. J., "Comparative study of nanohydroxyapatite microspheres for medical applications", J Biomed Mater Res A 2008;86:483-493.