



---

---

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

“CEMENTOS ÓSEOS OBTENIDOS A PARTIR DE  
FOSFATOS DE CALCIO Y QUITOSÁN”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIA  
E INGENIERÍA DE MATERIALES

P R E S E N T A

ING. SILVIA FLOR PIÑERA BARRERA

TUTORA: DRA. MA. CRISTINA PIÑA BARBA





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



## **Agradecimientos**

A mi familia por su incondicional apoyo, en especial a mi madre por ser ante todo mi amiga y cómplice.

A la Dra. Cristina Piña, por su guía y motivación en este trabajo, y sobre todo por su amistad.

A todos los compañeros del Laboratorio de Biomateriales: Adriana, Carolina, Nelly, Karla, Daniel; mil gracias por su amistad, consejos, apoyo y por estar ahí para resolver mis dudas sobre el laboratorio, cuestiones de química y preguntas existenciales en general. A Ariana por compartir además esta experiencia conmigo. A Benjamín, mi guía cibernética, por sus valiosas enseñanzas al inicio de este trabajo.

A todos aquellos que me ayudaron a la realización de las pruebas experimentales: I.Q. Leticia Baños, Dr. José Guzmán, Dr. Alfredo Maciel, Dr. Ernesto Sánchez; así como al Sr. Eduardo Caballero por sus maravillosas fotografías.

A quienes ayudaron con las últimas revisiones a este trabajo, aportando valiosos comentarios: Dr. Pedro Bosch, Dr. Ricardo Vera, Dr. Lauro Bucio y Dr. Armando Ortiz.

A mis amigos por su apoyo, por siempre estar ahí y por las horas de distracción y plática; especialmente a Mane y Luis, por la gran paciencia que me han tenido y por saber entenderme.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A CONACYT y DGEP por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de maestría.

La gente dice:  
    Polvo,  
    Sideral,  
    Funerario,  
y se queda tranquila,  
    contenta,  
    satisfecha.  
Pero escucha ese grillo,  
    esa brizna de noche,  
    de vida enloquecida.  
Ahora es cuando canta  
    Ahora  
    y no mañana  
Precisamente ahora.  
    Aquí.  
    A nuestro lado...  
como si no pudiera cantar en otra parte.  
    ¿Comprendes?  
    Yo tampoco.  
Yo no comprendo nada.  
No tan sólo tus manos son un puro milagro.  
    Un traspies,  
    un olvido,  
y acaso fueras mosca,  
    lechuga,  
    cocodrilo.  
    Y después...  
    esa estrella.  
No preguntes.  
    ¡Misterio!  
    El silencio.  
    Tu pelo.  
    Y el fervor,  
    la aquiescencia  
    del universo entero,  
para lograr tus poros,  
    esa ortiga,  
    esa piedra.  
Puedes juntar las manos.  
    Amputarte las trenzas.  
Yo daré mientras tanto tres vueltas de carnero.

*(Puedes juntar las manos, Oliverio Girondo)*

## **Prólogo (que nada tiene que ver)**

El tema de los biomateriales apareció en mi camino casi por azar, y a pesar de mi formación como ingeniero, inmediatamente llamó mi atención: qué mejor forma de descubrir quién soy que empezando por mis propios huesos. Ah si, porque en realidad para mí todo es intentar explicarme, y con eso intentar entender al mundo; en algunas ocasiones funciona al revés, y el comprender algo de lo de afuera me ayuda a entenderme a mi misma, pero viene siendo lo mismo. Entonces sea arte, ciencia, música, literatura, plática con amigos, embobarse viendo la luna... todo ayuda a responder la gran pregunta, el gran misterio que somos nosotros mismos, a estar más cerca de eso que (de nuevo), ando buscando, aunque no sepa qué es.

Escribo esto porque quiero hacer la aclaración de que las razones acostumbradas para estar aquí no son las mías. El que los biomateriales tengan un futuro prometedor, la satisfacción de investigar un tema que implica necesariamente un bien humano, el ayudar al progreso de la ciencia; nada de eso pasa en realidad por mi mente cuando hablo con gusto del trabajo que hice. No, en realidad soy egoísta y mi interés es meramente personal.

Tal vez con esto todos aquellos que pensaban que la ciencia no era para mí ahora me entiendan, y a quienes compartieron conmigo parte de este camino ya no les parezca tan extraña mi forma de ver las cosas, las preguntas que solía hacer que no tenían que ver con el tema.

Al final, ¿cumplicé con ese propósito personal? Sé que sí. Ahora puedo salir y ver el mundo distinto, maravillarme con más cosas, jugar un poco más mi vida, y con una enorme satisfacción decir que yo tampoco, que yo no comprendo nada.

# ÍNDICE

Resumen .....	1
Introducción .....	2
Biomateriales .....	2
Biomateriales ortopédicos .....	4
Hueso .....	8
Cerámicas de fosfato de calcio .....	12
Hidroxiapatita .....	14
Cementos de fosfato de calcio .....	17
Proceso cementante .....	17
Tiempos de reacción .....	20
Modificaciones y avances de los CPC .....	21
Quitósán .....	26
Biocompatibilidad .....	29
Quitósán en formulaciones de CPC .....	31
Propuesta y objetivos .....	32
Método experimental .....	33
Obtención de la fase sólida .....	33
$\alpha$ -TCP .....	33
HA .....	34
Molienda .....	34
Mezcla de polvos .....	35
Fase líquida .....	36
Quitósán .....	36
Formulación de los cementos .....	38
Caracterización de las pastas .....	40
Resultados y discusión .....	44
Adición del quitósán .....	44

Tiempos de reacción .....	46
Resistencia mecánica .....	48
Evolución química .....	53
Microestructura .....	60
Medición del pH .....	66
Discusión global .....	67
Conclusiones .....	71
Referencias .....	73

## **RESUMEN**

El desarrollo de los biomateriales tiene como principal objetivo el poder contar con materiales adecuados para la implantación médica. Específicamente, en el caso de los cementos óseos, el estudio se ha centrado en aquellos basados en fosfatos de calcio y en cómo mejorar algunas de sus propiedades, tales como su resistencia mecánica, tiempos de reacción, biocompatibilidad y tiempo en el que se reabsorben por el organismo.

El quitosán es un biopolímero natural que ha demostrado tener, entre otras propiedades biocompatibles, la capacidad de regular el crecimiento de células óseas, por lo que resulta de especial interés su inclusión en formulaciones de cementos óseos.

En este trabajo se propone agregar cantidades distintas de quitosán a una misma formulación de cemento, con el fin de analizar los cambios ocurridos durante el proceso cementante de cada una de las pastas. Los estudios realizados estuvieron enfocados en las propiedades básicas de los cementos, tales como tiempos de reacción, resistencia mecánica, productos de reacción y morfología cristalina.

# **INTRODUCCIÓN**

## **Biomateriales**

La necesidad de materiales adecuados para su uso en la medicina ha generado toda una nueva rama de investigación en aquellos conocidos como *biomateriales*, estos incluyen partes o la totalidad de prótesis, implantes y materiales “inteligentes” portadores de células o fármacos diseñados para cumplir con funciones específicas.

Los biomateriales son aquellos materiales destinados a estar en contacto con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del cuerpo humano<sup>[1]</sup>.

Para que algo sea clasificado como biomaterial debe cumplir con los requisitos básicos de no ser rechazado por el organismo, no ser tóxico ni carcinógeno, así como tener una resistencia mecánica adecuada y en su caso un tiempo de degradación también adecuado. Además se debe considerar que dentro del organismo ocurren cambios y reacciones constantes, por lo que es fundamental que, tanto los componentes del material como sus productos de biodegradación, sean biocompatibles.

A partir de esto, los materiales pueden clasificarse según su grado de biocompatibilidad en:

- Tóxicos: cuando no cumplen los requisitos, matando o dañando células de forma directa.
- Inertes: estos materiales se encapsulan por un tejido fibroso como reacción del organismo, sin embargo no causan ningún tipo de rechazo. Su fijación se produce por un anclaje únicamente mecánico.
- Biocompatibles: no causan reacción o rechazo del organismo y a diferencia de los biomateriales inertes, éstos no se encapsulan por un tejido fibroso, entre ellos se encuentran las aleaciones de titanio y el acero inoxidable 316L.
- Bioactivos: su característica es la capacidad de interactuar con su entorno mediante enlaces químicos, sin embargo mantienen su estabilidad estructural y química.
- Reabsorbibles: estos últimos se degradan dentro del organismo para cumplir con una función a un plazo de tiempo determinado, la liberación de fármacos o bien para dar paso a su sustitución por tejido sano.

Debido a que la biocompatibilidad se define como la capacidad de un determinado material para dar una respuesta apropiada en una aplicación específica, el diseño de un biomaterial no implica únicamente su composición química, sino que debe considerarse la forma, el tamaño, la resistencia, las características superficiales y el lugar donde va a ser implantado. Así mismo, su correcto funcionamiento dependerá del organismo receptor y de aspectos tan variables como la edad, sensibilidad inmunológica, estado de salud, herencia genética, etc.<sup>[1]</sup>.

Al momento de tener que tomar en cuenta tantas variables, no resulta difícil entender que el estudio y desarrollo de los biomateriales

requiere de la participación no sólo de químicos y físicos que se involucren con el material en sí, sino de biólogos que realicen pruebas de citotoxicidad y cuiden la interacción celular, ingenieros que contemplen el aspecto funcional del material y médicos que evalúen su manejo, implantación y seguimiento clínico. Este aspecto interdisciplinario de los biomateriales se ve enriquecido no sólo por la variedad de aspectos que involucra, sino por la visión particular que cada una de estas ciencias aporta al momento de trabajar en conjunto.

## **Biomateriales ortopédicos**

Los avances en el desarrollo y la caracterización de nuevos materiales se han visto reflejados en el progreso de los biomateriales. De esta forma la cirugía ortopédica cuenta ahora con materiales para la sustitución y la reparación ósea con funciones específicas, ya que se han diseñado materiales de osteosíntesis para mejorar el tiempo y la calidad en la reparación de fracturas, prótesis para sustituir articulaciones dañadas, rellenos para casos de pérdida por traumatismo, tumores o infección, así como materiales para contrarrestar el deterioro del metabolismo óseo. Básicamente todos estos materiales pueden dividirse en metálicos, poliméricos, cerámicos y compuestos.

La característica más atractiva de los metales para su uso ortopédico es su alta resistencia mecánica, lo que los convierte en la primera opción para aplicaciones estructurales. Para que un metal o aleación sea aceptado como biomaterial debe tener una buena resistencia a la corrosión, ya que al ser implantado se enfrentará a un ambiente hostil (cuerpo humano) que fácilmente puede degradarlo a productos dañinos para el organismo. Los principales biometales que se han desarrollado

son el acero inoxidable austenítico 316L, aleaciones de titanio como Ti-6Al-4V y aleaciones de cromo-cobalto, y son utilizados principalmente en prótesis articulares (ver figura 1) y su fijación.



**Figura 1.** Prótesis de cadera hecha a base de titanio con el vástago femoral cubierto de hidroxiapatita para mejorar su fijación al hueso vivo.

A pesar de que estos biometales presentan excelente resistencia mecánica, ligereza y fácil manufactura, su estructura difiere mucho de la del hueso vivo, y su alta dureza desgasta el hueso alrededor del implante, resultando en una pérdida de fijación. Ante estos problemas los materiales poliméricos se utilizan por ejemplo como cúpula intermedia en prótesis de cadera y rodilla (ver figura 2), como es el caso del polietileno de ultra-alto peso molecular el cual ayuda a soportar cargas en la prótesis y evita el desgaste del hueso, sin embargo el mismo material tiene poca resistencia al desgaste, lo cual le da una vida limitada a la prótesis completa.

Entre los biopolímeros de uso ortopédico están los acrílicos como el polimetacrilato de metilo (PMMA), el cual cumple la función de cemento óseo ya que resulta sencillo de implantar, sirviendo de material de anclaje debido a su facilidad para ajustar las prótesis a la forma y tamaño necesarios de la cavidad al inyectarse de forma líquida.

Estos biocementos presentan buenas propiedades de resistencia mecánica a compresión y resistencia a la corrosión, sin embargo tienen la enorme desventaja de endurecerse *in situ* mediante una reacción de polimerización que genera altas temperaturas, causando necrosis del tejido óseo y su eventual desprendimiento. Además, estos cementos no son reabsorbidos por el organismo, lo cual no permite la regeneración del tejido óseo.



**Figura 2.** Distintas copas acetabulares para prótesis de cadera, la flecha indica el recubrimiento de polietileno de una de ellas.



**Figura 3.** Implantes de hidroxiapatita con forma de tornillo para fijación.

Los biocementos también tienen otras aplicaciones ortopédicas, ya que las lesiones causadas en huesos por la remoción de tumores o alguna malformación requieren de un material de relleno, ya sea en forma de gránulos o, mejor aún, de un material moldeable al momento de su implantación. En casos muy concretos, el PMMA ha sido utilizado como material de relleno en cavidades tumorales tras la extracción del tumor<sup>[1]</sup>.

Las biocerámicas presentan las mismas características que los materiales cerámicos comunes, como su dureza, fragilidad y resistencia

al desgaste. Estas incluyen materiales inertes como el óxido de zirconio ( $ZrO_2$ ) y la alúmina ( $Al_2O_3$ ), excelentes para aumentar las propiedades de otros materiales tanto poliméricos como de otros cerámicos, los cuales además pueden usarse como relleno con la forma requerida previamente maquinada (ver figura 3). Sin embargo, las biocerámicas que presentan propiedades más atractivas para su aplicación ósea son las formadas con base en fosfatos de calcio, ya que tienen una mayor similitud con las características del hueso.

De esta forma, para desarrollar un biomaterial más noble para el organismo y con mejores propiedades, es necesario realizar una revisión de las características que tienen los tejidos que hay que reemplazar, en este caso el hueso.

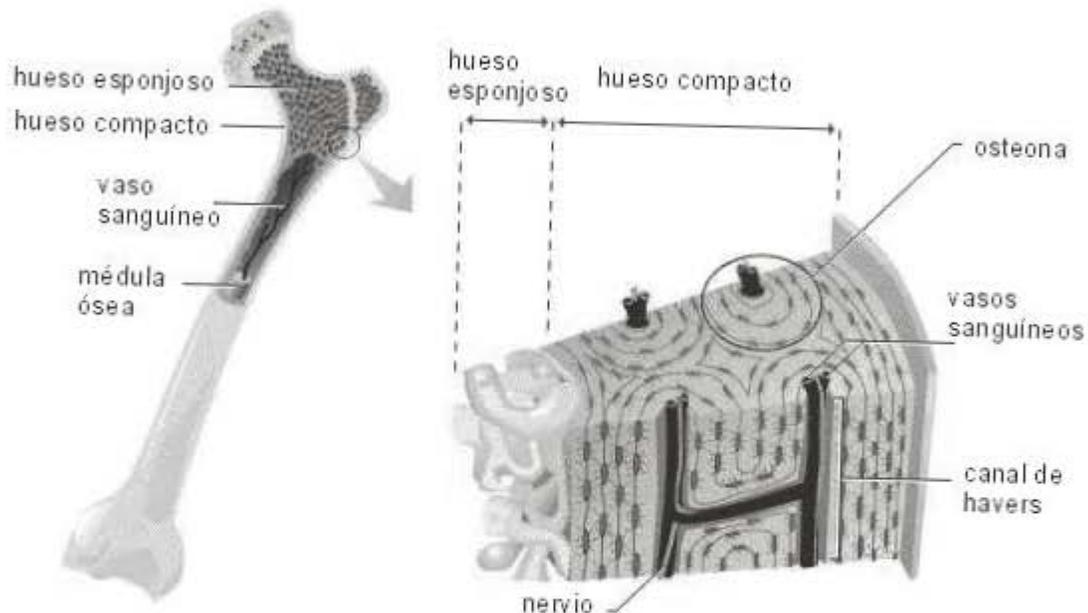
## Hueso

El hueso o tejido óseo, es un tejido conjuntivo especializado encargado de dar soporte y protección a los demás órganos del cuerpo, ayuda a la locomoción y al movimiento corporal ya que proporciona puntos de sujeción con la musculatura, y participa en procesos de equilibrio mineral de la sangre, siendo considerado el depósito de calcio para todo el organismo. A diferencia de lo que comúnmente se piensa, se trata de un tejido vivo y no sólo de una estructura rígida e inerte, ya que está conformado por diversas células que se encargan de su mantenimiento y regeneración continua; además se encuentra altamente vascularizado y en el interior de los huesos largos se localiza la médula ósea, la cual produce las células sanguíneas.

Desde el punto de vista del material, el hueso es un compuesto que conjunta las propiedades de resistencia y rigidez de una fase inorgánica con la flexibilidad de otra orgánica, las cuales en conjunto forman la matriz ósea que corresponde alrededor del 98% del hueso, dejando el restante a las células óseas.

La fase orgánica representa de un 30 a 40 % del peso del hueso y está formada por proteínas, principalmente de colágena tipo I en forma de fibras<sup>[2]</sup>. La fase inorgánica está compuesta por fosfatos de calcio, mayormente en forma de hidroxiapatita (HA) biológica, la cual contiene elementos traza de magnesio, flúor, sodio y potasio entre otros. La HA es depositada en forma de sales amorfas, y posteriormente forma cristales de apatita en forma de agujas, los cuales se orientan a lo largo de las fibras de colágena<sup>[3]</sup>. La relación calcio/fósforo (Ca/P) depende del tipo de hueso y de la edad de la persona, siendo en promedio de 1.61<sup>[4]</sup> para una persona joven (30 años).

De esta forma se obtiene un material con una resistencia similar a la del hierro, pero con una mayor ligereza y diez veces más flexible; donde los fosfatos de calcio proporcionan resistencia a las fuerzas cortantes y de compresión, y las fibras de colágena por su parte dan resistencia a fuerzas de tensión y a la flexión del hueso.



**Figura 4.** Corte esquemático de un hueso largo.

Las propiedades biomecánicas del hueso dependen del grado de mineralización de la matriz ósea, su contenido de agua, su forma anatómica y de su estructura. Desde este punto de vista estructural existen dos tipos de hueso: esponjoso y compacto<sup>[5]</sup> (ver figura 4).

El hueso esponjoso se caracteriza por tener una estructura macroporosa, ya que está formado por un entramado tridimensional de trabéculas ramificadas que se orientan paralelas a las líneas de fuerza, el interior de los espacios internos se encuentran rellenos de médula ósea. Debido a esta estructura porosa rellena de líquido, el hueso

esponjoso (también llamado trabecular) es resistente a cargas axiales y a fuerzas de impacto.

El hueso compacto o cortical está formado por una masa sólida en forma de láminas cilíndricas y concéntricas a unos finos conductos llamados canales de Havers, los cuales se comunican entre sí por conductos transversales conocidos como canales de Volkmann, que alojan nervios y vasos sanguíneos. Debido a esta estructura, las propiedades del hueso cortical son altamente anisotrópicas, es decir que su resistencia mecánica depende de la dirección y forma en la que se aplican las cargas.

Desde un punto de vista microscópico existen tres tipos de hueso: plexiforme, laminar y haversiano. El hueso plexiforme se encuentra en la etapa de crecimiento del individuo o bien cuando se produce un callo por fractura o tumor, ya que se trata de un hueso inmaduro que carece de una relación estable entre la parte mineral y la orgánica. Así, es gradualmente sustituido por hueso laminar, el cual está formado por una serie de láminas paralelas entre si, en medio de las cuales se albergan células óseas. Este hueso laminar forma las trabéculas del hueso esponjoso y las láminas concéntricas del cortical, donde recibe el nombre de hueso haversiano ya que en su conjunto forman los sistemas de Havers, también conocidos como osteonas.

El mantenimiento y regeneración del hueso está a cargo de las células óseas. Las más importantes son los osteoclastos, los osteoblastos y los osteocitos. Los osteoclastos son los responsables de la reabsorción del hueso al segregar pH ácido (de alrededor de 4), mientras que los osteoblastos regulan la mineralización ósea, ya que tienen la capacidad de depositar cristales de HA; durante este proceso los osteoblastos quedan atrapados dentro de la matriz, transformándose

en osteocitos, los cuales se encargan del funcionamiento de la matriz ósea para mantener al hueso vivo<sup>[3, 5, 6]</sup>.

Las propiedades mecánicas de los huesos son anisotrópicas, presentando sus máximos en el sentido en que soportan la carga. Las fuerzas constantes que se ejercen sobre el tejido óseo remodelan su estructura, ya que las células son sensibles a estas cargas mecánicas. De esta forma es un tejido dinámico que se adapta a las necesidades de carga de cada persona según sus actividades, adquiriendo la forma anatómica necesaria para cumplir con su función.

Anatómicamente los huesos se pueden clasificar en largos, cortos y planos. Los huesos largos como el fémur poseen forma cilíndrica en el centro, conocida como diáfisis y dos extremos más anchos conocidos como epífisis, los cuales adquieren la forma necesaria para articularse entre sí. Este tipo de hueso proporciona movilidad y soporta las cargas del cuerpo. Los huesos planos, por su parte, están destinados a la protección de otros órganos, como el omóplato, el cráneo y la caja torácica.

## **Cerámicas de fosfato de calcio**

Diversas enfermedades como osteoartritis, osteosarcoma y artrosis, además de traumatismos por accidentes, requieren de algún material para la sustitución y reparación ósea, ya que la utilización de tejido óseo del mismo paciente no siempre es posible debido principalmente a que la disponibilidad del material es limitada. Este tipo de implantes, conocidos como autólogos, presentan además la complicación de necesitar de una cirugía previa (con todos los riesgos que implica) para remover el material necesario. Es por esto que se buscan otras fuentes para obtener materiales con características semejantes a las del hueso.

Dentro de los materiales cerámicos, aquellos formados por fosfatos de calcio son de especial interés debido a su compatibilidad con la fase mineral del tejido óseo.

Estas cerámicas tienen la característica de presentar buena adherencia con el tejido vivo, de forma que se trata de materiales bioactivos, en los cuales ocurre una colonización de osteoblastos por parte del hueso vivo y con ello la osteointegración del implante<sup>[7]</sup>.

En la tabla 1 se muestran los fosfatos de calcio comúnmente usados en aplicaciones médicas, así como su relación calcio/fósforo (Ca/P) ya que para que estos compuestos puedan ser biocompatibles esta relación debe encontrarse entre 0.5 y 2<sup>[8]</sup>.

La utilización de estas cerámicas se puede hacer en forma de gránulos de diversos tamaños o bien maquinando previamente la forma deseada, lo cual puede resultar difícil considerando que las necesidades de cada cirugía son distintas. Este factor representa una desventaja en la utilización de estas cerámicas en comparación con otros materiales

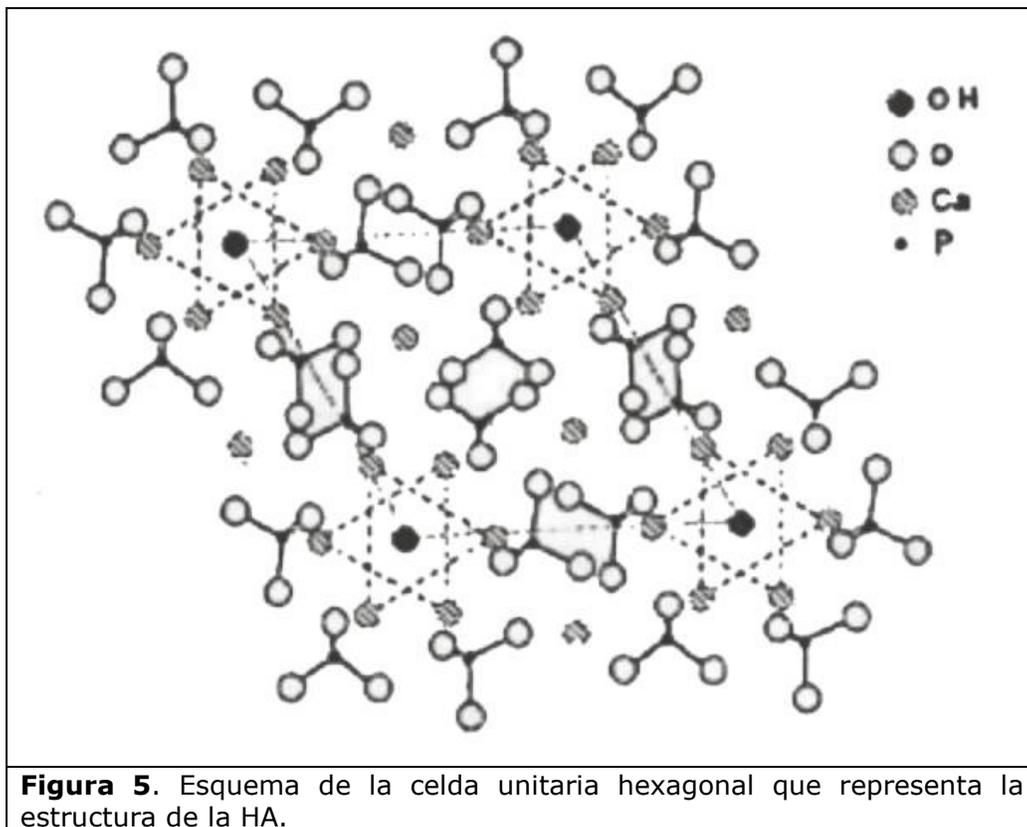
que son inyectables; sin embargo representan la base de estudio de los cementos de fosfatos de calcio, los cuales sí son moldeables.

**Tabla 1.** Fosfatos de calcio usados en aplicaciones médicas.

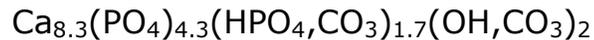
Compuesto	Fórmula	Abreviatura	Ca/P
Fosfato tetracálcico	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	TTCP	2
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	HA	1.67
Hidroxiapatita deficiente en calcio	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x} \ (0 < x < 1)$	CDHA	1.5-1.67
Hidroxiapatita biológica	$\text{Ca}_{8.3}(\text{PO}_4)_{4.3}(\text{HPO}_4, \text{CO}_3)_{1.7}(\text{OH}, \text{CO}_3)_2$	-	1.5-1.67
$\alpha$ - fosfato tricálcico	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\alpha$ -TCP	1.5
$\beta$ - fosfato tricálcico	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\beta$ -TCP	1.5
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	OCP	1.33
Fosfato cálcico amorfo	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$	ACP	1.2-2.2
Fosfato dicálcico anhidro	$\text{CaHPO}_4$	D CPA	1
Fosfato dicálcico dihidratado	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	D CPD	1
Fosfato cálcico monohidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	M CPM	0.5
Fosfato cálcico anhidro	$\text{Ca}(\text{H}_3\text{PO}_4)_2$	M CPA	0.5

## Hidroxiapatita

La hidroxiapatita (HA) es el fosfato de calcio con el tipo estructural de la HA biológica, por lo que resulta el material ideal para la sustitución ósea. El término "apatita" describe una familia de compuestos con estructura similar: sistema cristalino hexagonal y grupo espacial  $P6_3/m$ <sup>[9]</sup>; en el caso de la HA, se trata de una hidroxiapatita de calcio cuya celda unitaria está constituida por diez cationes de calcio  $[Ca^{2+}]$ , seis radicales de fosfato  $[PO_4^{3-}]$  y dos de hidroxilo  $[OH^-]$ ; organizados de tal forma que se obtienen tres sales ternarias idénticas de fosfato tricálcico  $[Ca_3(PO_4)_2]$  y un hidróxido de calcio  $[Ca(OH)_2]$ <sup>[2]</sup> (ver figura 5). Su fórmula química es  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ .



La HA biológica o dahllita<sup>[10]</sup> es compleja, difiere de la HA pura en composición, tamaño de cristal y morfología, además presenta deficiencia de calcio así como iones o radicales traza que la hacen no estequiométrica. Su fórmula química puede escribirse como:



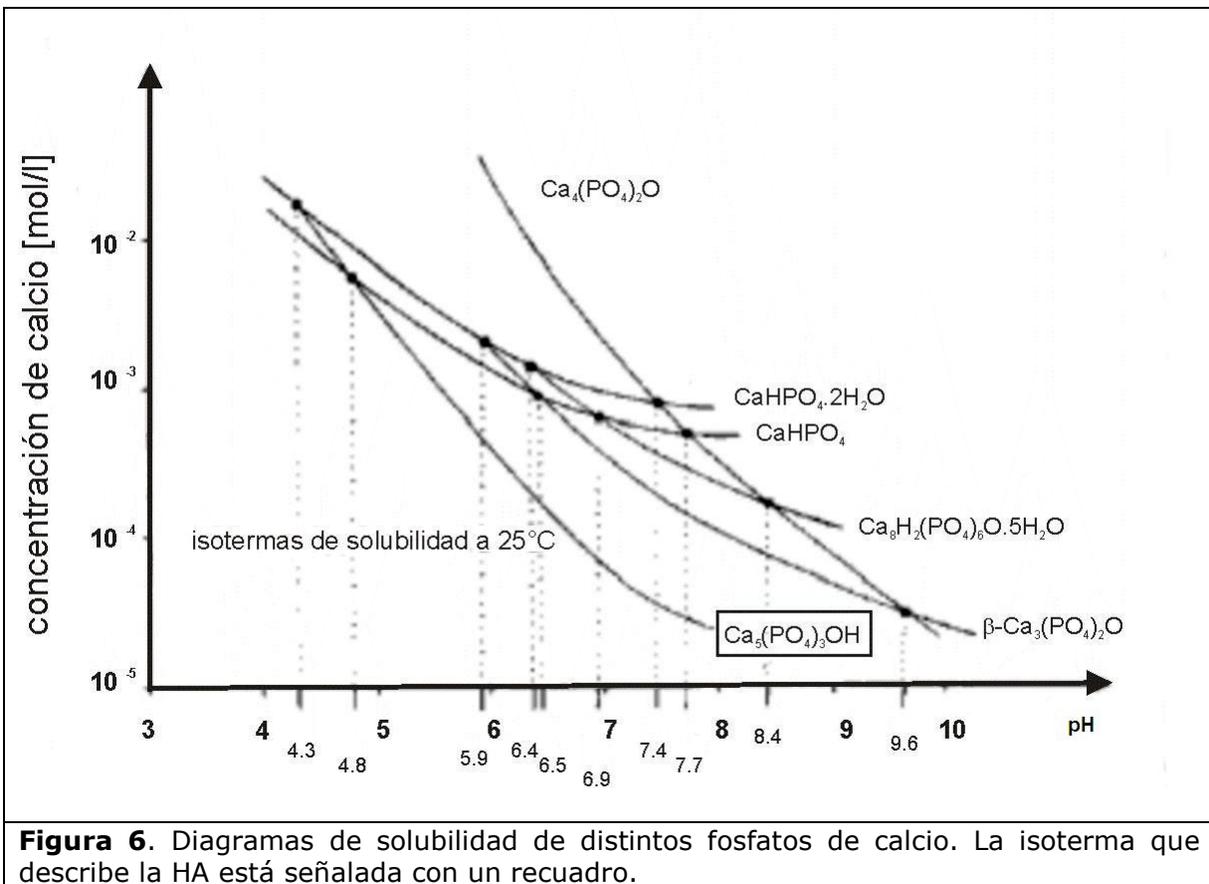
En donde los carbonatos ( $\text{CO}_3$ ) indican que pueden encontrarse sustituyendo el grupo fosfato ( $\text{HPO}_4$ ), el hidroxilio ( $\text{OH}$ ) o ambos, ya que se trata de una HA carbonatada, la cual contiene además elementos traza como magnesio, flúor, sodio y potasio entre otros<sup>[2, 9]</sup>. La forma en la que estos carbonatos y elementos traza se presentan depende del tipo de hueso, la edad, la persona, etc. Así mismo la relación calcio/fósforo ( $\text{Ca/P}$ ) varía, siendo de 1.67 para la HA pura y en promedio de 1.62 para el esmalte en huesos humanos y de 1.64 para la dentina; en los huesos esta relación varía además con la edad, ya que con ella se incrementa<sup>[2]</sup>.

La HA mineral natural y la contenida en la dentina de los dientes y en los huesos presenta un sistema cristalino hexagonal, mientras que la del esmalte de los dientes es monoclinica; la sintetizada en laboratorio puede tener cualquiera de los dos sistemas, dependiendo del proceso químico que se realice<sup>[2]</sup>.

De forma sintética, la HA puede ser obtenida por diferentes métodos como hidrólisis, reacciones en estado sólido, método sol-gel, etc.

Sin embargo la obtención de HA deficiente en calcio no es sencilla. Esto puede realizarse mediante procesos de hidrólisis de otros fosfatos de calcio (ACP, DCPD, TCP, etc.), en soluciones con iones hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) o fosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) a temperaturas de 37-100°C<sup>[9]</sup>, como ocurre con la preparación de los cementos de fosfato de calcio (CPC). Estas reacciones dependen del pH, la temperatura y la presencia de iones adicionales.

La solubilidad de los distintos fosfatos de calcio obedece a diversos factores como el tipo y concentración de la solución, el pH, grado de saturación, composición y cristalinidad de la HA, así como de la porosidad, los defectos en la estructura y la presencia de fases distintas<sup>[11]</sup>. A este respecto, la HA es el fosfato de calcio que presenta una menor velocidad de disolución en condiciones fisiológicas (ver figura 6); esto tanto en condiciones normales (temperatura de 37°C, pH de 7.4), como durante los procesos naturales de remoción de tejido óseo llevado a cabo por los osteoclastos (pH de 4 aproximadamente).



**Figura 6.** Diagramas de solubilidad de distintos fosfatos de calcio. La isoterma que describe la HA está señalada con un recuadro.

## **Cementos de fosfato de calcio**

El principal objetivo en la síntesis de los cementos de fosfato de calcio (CPC) para la restauración ósea, es conseguir una pasta moldeable que al endurecer o fraguar forme un material cerámico rígido que rellene el espacio deseado. La formación de esta pasta se lleva a cabo mediante la mezcla de una fase sólida en polvo compuesta por uno o más fosfatos de calcio y una fase líquida utilizada como vehículo cementante, la cual puede ser simplemente agua o bien, soluciones de fosfatos u otros aditivos.

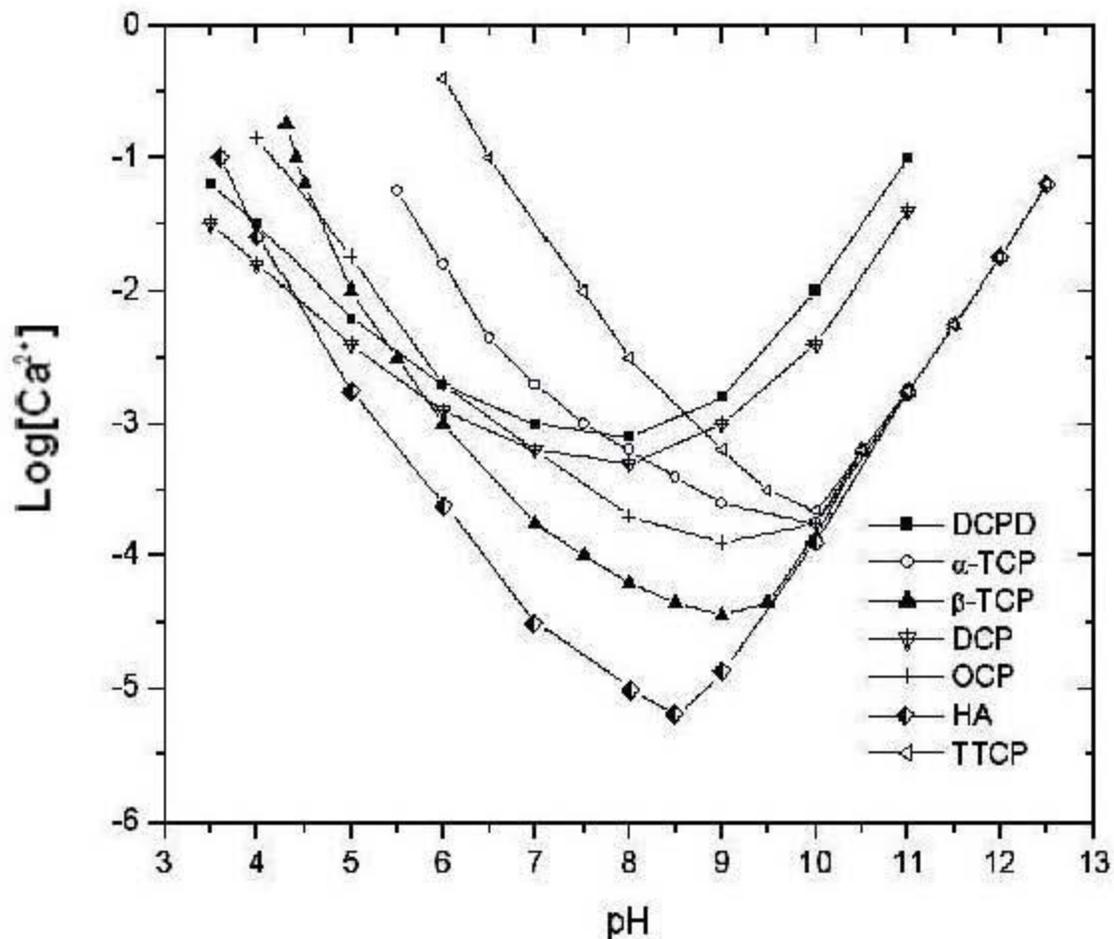
La química básica de los CPC no es muy complicada cuando se analiza un proceso de reacciones de disolución-precipitación, sin embargo, existen parámetros que determinan el proceso y el producto final, como la temperatura, el pH, el tamaño de partícula, la relación entre la fase líquida y la sólida (L/P), la relación calcio/fósforo (Ca/P) de los fosfatos utilizados y cualquier aditivo o material utilizado para formar un compuesto.

### **Proceso cementante**

La composición de la fase sólida del cemento determina el proceso de fraguado y el producto obtenido. A este respecto, se ha encontrado que el alfa fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP) fragua para formar hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA)<sup>[8, 12]</sup>.

La termodinámica de las sales de fosfatos de calcio permite la predicción de los posibles precipitados que se obtienen a partir de soluciones supersaturadas durante las reacciones de cementación. En la

figura 7 se muestra el diagrama de solubilidad para el sistema  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$  a  $37^\circ\text{C}$ . En este diagrama se aprecia una pendiente negativa de las distintas sales de fosfato de calcio en la zona ácida, lo cual se refiere a que estos compuestos son más solubles conforme el pH disminuye, sin embargo una vez que el pH llega a la zona alcalina, la solubilidad de nuevo aumenta. Así se indica la estabilidad relativa de estos compuestos, de donde se puede apreciar que en el intervalo de pH entre 4.2 y 9.7 la HA es la sal menos soluble<sup>[13]</sup>.

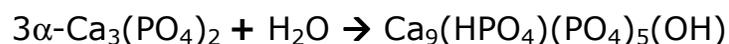


**Figura 7.** Diagrama de solubilidad para el sistema  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$  a  $37^\circ\text{C}$

De esta forma, al solubilizar un fosfato de calcio con una solubilidad alta (como en el caso del  $\alpha$ -TCP), se favorece la precipitación de HA ya que es el compuesto termodinámicamente más estable al tener la solubilidad más baja.

La reacción de fraguado se conforma de dos etapas, en la primera ocurre la disolución de las sales de fosfato de calcio y en la segunda la precipitación de la nueva sal formada. Esta precipitación se lleva a cabo mediante la nucleación del producto, en donde se debe cumplir una relación área-volumen del embrión nucleante para alcanzar estabilidad termodinámica y así dar paso al crecimiento de cristales, los cuales se entrecruzan para formar redes rígidas que le dan sus propiedades mecánicas a los cementos.

En los cementos formados a base de  $\alpha$ -TCP, la hidrólisis de este fosfato puede llevar a diferentes mezclas de DCPA, DCPD, OCP e CDHA dependiendo de las condiciones en las que se realice<sup>[8]</sup>. La reacción de hidrólisis para la formación de CDHA puede escribirse de la forma siguiente:



Sin embargo esta expresión no representa lo que en realidad ocurre en las formulaciones de cementos en las que se utilizan soluciones de fosfatos adicionales a modo de aceleradores de reacción.

A temperaturas de 37-40 °C, se ha reportado que se obtienen como productos de reacción brushita (DCPD) a  $\text{pH} < 5.5$ , fosfato octacálcico (OCP) a  $7.5 < \text{pH} < 5.5$  e hidroxiapatita (HA) a  $\text{pH} > 7.5$ <sup>[8]</sup>. También se ha descrito que la evolución de  $\alpha$ -TCP a HA se lleva a cabo pasando por estos fosfatos como productos intermedios de reacción, de forma que el DCPD se obtiene de forma inmediata al entrar el polvo en contacto con la fase líquida, el cual posteriormente se transforma en OCP para finalmente formar HA<sup>[14]</sup>.

## Tiempos de reacción

Los tiempos de reacción que deben considerarse al momento de diseñar un cemento de fosfato de calcio (CPC) son los de cohesión, fraguado inicial y fraguado final, así como el tiempo total en el que se completa la reacción.

El tiempo de cohesión (C) se refiere al tiempo necesario para que la pasta tenga la suficiente rigidez para que al momento de entrar en contacto con una solución líquida (es decir, al ser implantado), ésta no se desintegre. Este parámetro es de gran importancia en los CPC para uso médico, ya que las pastas se preparan al momento de la cirugía, cuando la administración del tiempo debe ser cuidadosa.

Los tiempos de fraguado, tanto inicial como final, miden dos durezas diferentes de las pastas, así como su utilidad para ser implantado: el tiempo de fraguado inicial (I) indica el tiempo en el que la pasta puede ser modelada sin provocar daños estructurales, mientras que el tiempo de fraguado final (F) indica el tiempo en que el cemento puede ser manipulado sin ser deformado. Así mismo debe considerarse el tiempo total de fraguado, es decir el tiempo transcurrido desde que comienza hasta que termina de fraguar cada pasta (F-I), ya que éste da una referencia del tiempo que el paciente debe estar inmovilizado a partir de que la pasta ya no puede ser moldeada por el cirujano.

Existen varios métodos para medir los tiempos de fraguado. El método de agujas de Gillmore<sup>[15]</sup> utiliza dos indentadores diferentes: una aguja gruesa con un peso ligero para medir el tiempo I, y una aguja fina con un peso mayor para medir el tiempo F. Se considera que estos tiempos de reacción se han alcanzado cuando al colocar cada aguja sobre la superficie del cemento, no queda ninguna huella sobre la superficie.

A pesar de que la medición de estos tiempos en el laboratorio puede ser relativa y no reflejar las condiciones reales de una cirugía (como geometría de implantación y cantidad de cemento), permite hacer comparaciones útiles entre distintas formulaciones de CPC y sus propiedades.

## **Modificaciones y avances de los CPC**

A pesar de las ventajas que los CPC presentan sobre otros materiales, aún existen algunas características que deben mejorarse, principalmente su baja resistencia mecánica que limita su uso en aplicaciones donde no se reciben cargas mecánicas. Debido a esto, los CPC aún siguen siendo un tema importante en el estudio de biomateriales, empleando diferentes modificaciones y aditivos con el fin de diseñar un material con mejores características.

Puede considerarse que las características que el CPC ideal debe tener son:

- Tiempo de cohesión cercano a cero que permita su inmediata implantación
- Tiempos de fraguado lo suficientemente cortos, que permitan al cirujano manejar la pasta e implantarla
- Resistencia mecánica adecuada, es decir, lo más similar al hueso posible
- Velocidad de degradación igual a la velocidad del crecimiento del nuevo tejido óseo
- Porosidad controlada
- Facilidad de implantación y preparación de la pasta

Las propiedades básicas de los CPC pueden cambiar considerablemente haciendo un ajuste en la relación líquido/polvo (L/P), ya que disminuyendo la cantidad de líquido agregado se disminuyen los tiempos de reacción y se obtiene un material más denso, aumentando las propiedades mecánicas. Sin embargo la cantidad de líquido debe ser tal que la fase sólida pueda disolverse a una velocidad adecuada, a este respecto algunos autores mencionan que la relación L/P no debe ser menor a 0.32ml/gr para tener una pasta moldeable y con cierta cohesión<sup>[16]</sup>.

Con respecto a la fase sólida el tamaño de grano del polvo es importante, ya que un polvo fino representa una mayor área superficial para optimizar la reacción de disolución, disminuyendo así el tiempo requerido para el fraguado de la pasta. Además, si se tiene un buen control en la distribución del tamaño de partícula, se tiene un mejor control de esta reacción.

Los aditivos pueden agregarse tanto en la fase líquida como en la sólida, generalmente en forma de iones de fosfato y/o calcio, los cuales sirven como aceleradores de la reacción de fraguado. Así, se pueden agregar agentes nucleadores como semillas de HA que ayudan a mejorar la cristalinidad del cemento resultante y a disminuir sus tiempos de reacción<sup>[17]</sup>.

Otro aspecto de gran importancia en el diseño de los CPC es su manejo y mezclado. Debido a que la reacción cementante comienza al mezclar las fases sólida y líquida, es necesario que el cirujano prepare la pasta al momento de implantarla, alargando así el tiempo de la intervención quirúrgica. Además el procedimiento puede complicarse un poco ya que los CPC deben tener cohesión suficiente para no desintegrarse al momento de entrar en contacto con los fluidos fisiológicos del paciente, conforme la pasta endurece pierde su fluidez y

su capacidad de ser implantada mediante el uso de una jeringa, propiedad que ha sido llamada *inyectabilidad*. El interés por esta propiedad radica en la facilidad de manejar la pasta y en la posibilidad de implantar el cemento mediante técnicas poco invasivas al paciente.

La inyectabilidad de un CPC se refiere a las propiedades reológicas de la pasta una vez preparada; de forma práctica se define como la capacidad de ser extruída sin presentar separación de fases sólido-líquido por filtrado a presión al momento de inyectar<sup>[18, 19]</sup>. Así los experimentos que caracterizan la inyectabilidad están basados en medir el porcentaje de pasta que puede extruirse mediante una jeringa y una carga constante.

Ante los problemas que surgen en este tema, algunos autores han sugerido el uso de agentes cohesivos como gelatina<sup>[20]</sup> o quitosán<sup>[21, 22]</sup>, o bien hacer formulaciones de cementos premezclados con una fase líquida no cementante como glicerina, la cual es desplazada por los fluidos fisiológicos que, al tratarse de una solución acuosa, sí reaccionan con el polvo del cemento<sup>[23]</sup>.

Para mejorar las propiedades mecánicas de los CPC, se han desarrollado materiales compuestos agregando partículas duras como  $ZrO_2$ <sup>[12]</sup> y  $Al_2O_3$  o bien fibras resistentes<sup>[24]</sup> que dan como resultado un material que asemeja bastante la estructura natural del hueso, sin embargo la implantación de estos cementos resulta complicada si se quiere una orientación específica de las fibras y su inyectabilidad se ve considerablemente reducida. Por otro lado, también se han añadido aditivos o agentes cohesivos con el fin de obtener un material final denso y poco poroso, o bien inhibidores de crecimiento cristalino para así también mejorar la resistencia del material.

**Tabla 2.** Resumen de avances en CPC.

Ref.	Polvo	Líquido	L/P	Aditivos	Tiempos de reacción	Propiedades mecánicas	Notas
8	$\alpha$ - TCP	CaCl <sub>2</sub> (1 M) NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.6 M) (1:1)	0.55	HA (1%)	$t_c = 12$ min $t_{tot} \sim 3d$	---	Solución líquida es usada como acelerador de reacción.
20	$\alpha$ - TCP (5%)	DCPD Agua destilada	0.30	gelatina (5, 10, 15, 20%)	$t_{fi} \sim 5$ min $t_{ff} \sim (10 - 14)$ min	$\sigma_c \sim 2.5$ MPa (ctrl) $\sigma_c \sim 12$ MPa (Gel 20)	Adición de gelatina reduce la porosidad, acelera el fraguado y aumenta propiedades mecánicas.
22	TTCP DCPA (1:1 mol)	Lactato de quitosán (15%) en agua destilada	0.30	---	---	$\sigma_f \sim 25.3$ MPa E $\sim 4.5$ GPa	Adición de quitosán aumenta las propiedades mecánicas.
26	TTCP DCPA (1:1 mol)	Agua	0.50 0.33	Fibras de Vicryl (25% vol)	$t_{tot} \sim 20$ h	$\sigma_f \sim 5$ MPa (ctrl) $\sigma_f \sim 15$ MPa (max)	Las fibras de Vicryl son añadidas para dar refuerzo a corto plazo al tiempo que se disuelven dejando macroporos.
12	$\alpha$ - TCP	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.6 M) CaCl <sub>2</sub> (0.1 M) (1:1)	0.55	HA (1%) ZrO <sub>2</sub> (9%)	$t_c = 1$ min $t_{fi} = 1:30$ h $t_{ff} = 9:30$ h	$\sigma_c = 12$ MPa E = 1359 MPa	ZrO <sub>2</sub> se agrega como partículas de refuerzo.
23	TTCP (73%) DCPA (27%) (1:1 mol)	HMC (1.1%) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (15%) en glicerina	0.30	---	$t_f = 92$ min	DTS@1d = 2.6 MPa DTS@7d = 4.9 MPa	CPC premezclado. Glicerina es sustituida por fluidos fisiológicos después de la implantación.
27	$\alpha$ - TCP (62.5%) DCPA (26.8%)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2%) o agua, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (8%) NaHCO <sub>3</sub> (10%)	0.35	HA (1.8%)	$t_{fi} \sim (4 - 6.5)$ min	$\sigma_c \sim (1.2 - 2.1)$ MPa	NaHCO <sub>3</sub> produce burbujas de CO <sub>2</sub> después que se agrega NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .
28	TTCP DCPA (1:1 mol)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1M)	0.25	Sucrosa (25%)	$t_f = 5$ min	DTS = 3.7 MPa	Sucrosa se disuelve dejando macroporos.

HMC = hidroxipropil-metilcelulosa,  $t_c$  = t. cohesión,  $t_{tot}$  = t. total de reacción  $t_{fi}$  = t. fraguado inicial,  $t_{ff}$  = t. fraguado final,  $\sigma_c$  = esfuerzo a compresión,  $\sigma_f$  = esfuerzo a flexión, DTS = esfuerzo a tensión diametral

La aplicación médica que tienen los CPC debe tomarse en cuenta al momento de diseñarlos, ya que si se requiere un material para la fijación de prótesis, es deseable que éste sea denso y poco poroso, ya que la pasta cementante actúa como un anclaje mecánico entre la superficie porosa del hueso y el implante metálico. No obstante, si lo que se desea es un material que sirva como relleno ante la remoción de un defecto o tumor, es recomendable que la estructura del material una vez endurecido sea lo suficientemente porosa (tamaño de poro entre 100 y 150µm) para que las células óseas crezcan dentro del material y lo reabsorban más rápido, al tiempo que el hueso vivo se regenera<sup>[25]</sup>. La mayor dificultad que presentan estas estructuras macroporosas es su baja resistencia mecánica, por lo cual también se ha planteado el agregar fibras reabsorbibles que cumplan con la función de dar resistencia a corto plazo mientras se degradan y dejan una estructura macroporosa, con un tiempo de degradación semejante al de la restauración del tejido óseo<sup>[26]</sup>.

Un resumen de algunos de estos avances se presenta en la tabla 2.

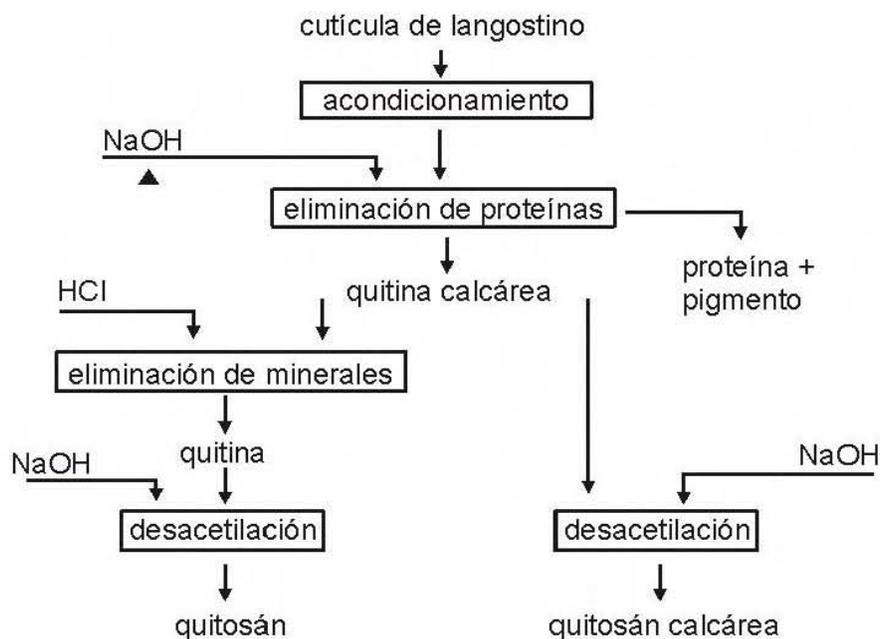
## Quitosán

La quitina es un biopolímero natural encontrado en los exoesqueletos de animales marinos, cutículas de insectos y en algunas plantas y hongos. Se trata de un polisacárido formado por grupos glucosamina y N-acetil glucosamina, con una unión  $\beta(1-4)^{[29, 30]}$ . El producto de su desacetilación es conocido como quitosán, el cual tiene una diversidad de aplicaciones industriales y un especial interés en el área biomédica gracias a sus propiedades biocompatibles y antibacteriales.

Tanto la quitina como el quitosán pertenecen a la familia de los glucosaminoglucanos (GAGs)<sup>[30, 31]</sup>, los cuales son sustancias que participan en la formación, manutención y reparación de tejidos estructurales; entre ellos se encuentran el ácido hialurónico, la heparina y el condroitinsulfato, los cuales forman gran parte de la matriz extracelular de tejidos como el cartílago, el músculo y el hueso. Sin embargo ninguno de los dos, quitina o quitosán, se encuentra presente en tejidos de mamíferos.

La obtención de estos biopolímeros es relativamente fácil, y su mayor atractivo se debe al aprovechamiento de lo que en otras circunstancias se considera desecho, como lo son los caparazones de camarón, cangrejo y otros animales marinos.

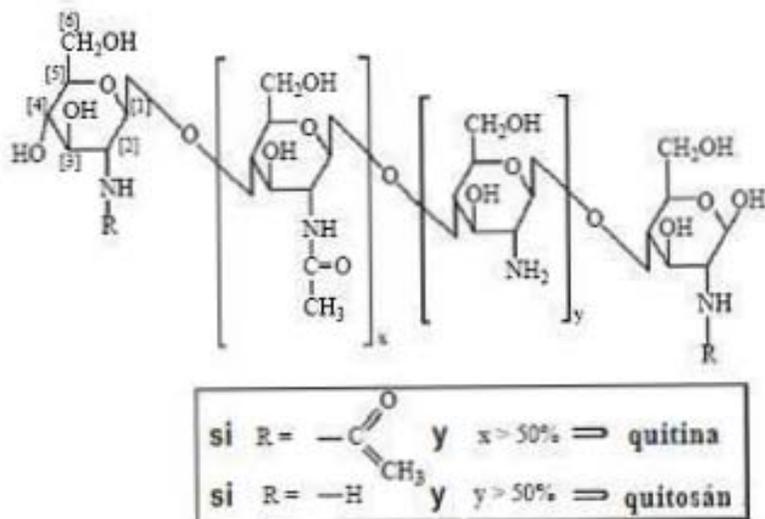
Estos caparazones son primeramente desmineralizados en un medio ácido y desproteinizados en un medio alcalino con calor, de este proceso se obtiene la quitina; posteriormente se realiza un proceso de desacetilación (generalmente en un medio alcalino) para obtener el quitosán (ver figura 8). Dependiendo del origen del material y del proceso llevado a cabo es que se consiguen polímeros con diferentes grados de desacetilación y peso molecular.



**Figura 8.** Obtención de quitina y sus derivados

La diferencia entre quitina y quitosán se encuentra en el grado de desacetilación de la sustancia, y por lo tanto en su capacidad de ser disuelta en ácidos diluidos. Generalmente se considera que a partir del 40-50% de desacetilación se trata de quitosán, o bien, una vez que puede ser disuelto en una solución de ácido<sup>[31]</sup>.

La estructura química de estos polisacáridos les da un carácter estructural gracias a sus enlaces tipo  $\beta$ , de manera muy similar a la celulosa (ver figura 9). Los grupos amino fácilmente forman enlaces de puentes de hidrógeno e interacciones de Van der Waals altamente hidrofóbicas, creando redes tridimensionales rígidas y provocando la total insolubilidad de la sustancia. Sin embargo un aumento de energía en el sistema dependiente de parámetros como el grado de acetilación, el peso molecular y el medio alrededor del material, puede favorecer la ruptura de estos enlaces y su disolución. Esto sucede por ejemplo con una disminución del pH del solvente, lo cual ayuda a protonizar los sitios amino del quitosán y lo hacen soluble a diferencia de la quitina.



**Figura 9.** Estructura química de la quitina y el quitosán. La numeración de los carbonos del primer grupo ayuda a identificar el enlace  $\beta(1-4)$ , ya que va del carbono 1 del primer grupo al 4 del segundo.

Las soluciones de quitosán son posibles de preparar a bajas concentraciones (menos de 3% w/w), ya que su capacidad de agregación de partículas y el aumento de viscosidad dificulta la solución de concentraciones mayores. Al ser diluido fácilmente forma geles, de donde se pueden obtener diversos productos de quitosán, como hilos, placas o esponjas.

Las sales de quitosán se logran al evaporar el agua de las soluciones<sup>[32]</sup>. Estas son compuestos formados por el quitosán y el grupo químico formado por el ácido de la solución, como el quitosán lactosado, fosforizado o acetilado, entre otros. Estos compuestos son fácilmente solubles en agua, reaccionan y forman complejos con muchos polímeros igualmente solubles como el polivinilalcohol, polietilenglicol, etc., por lo que resultan atractivos para aplicaciones biomédicas.

## **Biocompatibilidad**

Una de las características más atractivas del quitosán es el ser biocompatible y biodegradable. Al realizarse pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* se ha encontrado que es biocompatible, ya que su carácter catiónico (dado por los grupos amino sin enlazar) le da la propiedad de ser mucoadhesivo y de reaccionar con aniones tales como factores de crecimiento, proteoglucanos y paredes celulares, haciendo que las células se adhieran fuertemente y con buena propagación. Tiene la capacidad de soportar y regular el crecimiento y proliferación de células vasculares, neuronales, fibroblastos, células epiteliales, osteoblastos y condrocitos. Además se ha encontrado que presenta actividad antibacteriana, antiviral y antitumoral<sup>[1, 23]</sup>.

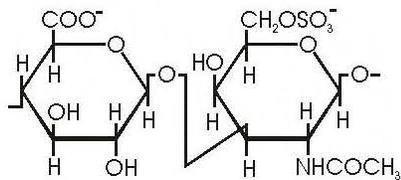
La discusión sobre el grado de biocompatibilidad del quitosán es complicada, ya que como ocurre con cualquier material, depende de la aplicación y el uso que se le de. En particular, el quitosán no sólo se ha propuesto en el área biomédica como material de implante, sino que se ha utilizado en dietas como auxiliares en el control de peso gracias a su capacidad de atrapar grasas y por no ser asimilado en el sistema digestivo. Sin embargo se han reportado desventajas en su uso ya que junto con las grasas, atrapa consigo a vitaminas y minerales<sup>[33]</sup>.

Por otra parte, las interacciones que ocurren entre el implante de quitosán y el medio vivo que lo rodea aún no son comprendidas del todo. Se ha reportado actividad antibacterial e incluso antitumoral, sin embargo, aún no queda clara la forma en la que actúa. A este respecto unos cuantos autores hablan del quitosán como un material ligeramente tóxico, ya que presenta una respuesta inmunológica del sistema al ser implantado, provocando la activación de anticuerpos y macrófagos que actúan sobre otros antígenos presentes. Sin embargo el sistema

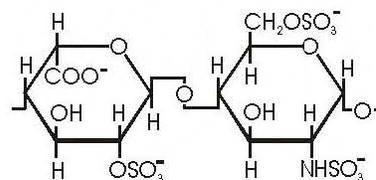
inmunológico humano no presenta anticuerpos para el quitosán, por lo que no es rechazado ni provoca daño dentro del organismo.

De esta forma, se dice que el quitosán cumple con la función de coadyuvante inmunológico, es decir que estimula al sistema inmune incrementando su respuesta hacia otros agentes inmunogénicos. Por otra parte la estructura química que posee se asemeja mucho a la de otros glucosaminoglucanos (GAGs) presentes en el cuerpo (ver figura 10), por lo cual fácilmente mimetiza algunas de las funciones que estos realizan en la matriz extracelular de tejidos conectivos.

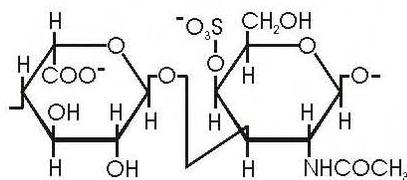
CONDROITIN-SULFATO



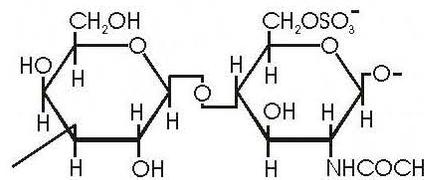
HEPARAN-SULFATO



DERMATAN-SULFATO



KERATAN-SULFATO



**Figura 10.** Estructura de algunos GAGs presentes en el cuerpo humano.

Con todas estas características la utilización del quitosán como material para uso médico tiene numerosas aplicaciones: hilos de sutura, esponjas y vendajes biodegradables, elementos para la liberación controlada de fármacos, materiales ortopédicos, aplicaciones dentales, etc. Asimismo es un material atractivo para usarse como andamiaje en la ingeniería de tejidos.

## Quitosán en formulaciones de CPC

La utilización de quitosán como aditivo en la formulación de cementos óseos cerámicos ha sido estudiada desde diferentes aspectos.

Por un lado existe el interés de formar un material compuesto que asemeje las características del hueso vivo al conjuntar una fase inorgánica cerámica y otra orgánica. De esta forma se han preparado tanto cementos poliméricos con refuerzos cerámicos de hidroxiapatita, como cementos de fosfato de calcio con partículas de algún polímero biocompatible como el poli(L-láctico)<sup>[34]</sup> y la policaprolactona.

También se han realizado formulaciones que contienen quitosán, en donde se ha mejorado considerablemente la consistencia y capacidad de moldear las pastas para adaptarse a la forma del defecto óseo<sup>[35]</sup>; o bien alguna sal de quitosán, como el quitosán fosforizado que ha reportado tener efectos en la forma y velocidad de degradación de los cementos una vez implantados<sup>[36]</sup>, así como un aumento en las resistencia mecánica, además de un ligero incremento en los tiempos de fraguado<sup>[37]</sup>.

Así mismo, debido a la alta viscosidad que se logra al obtener soluciones de quitosán, se ha utilizado para aumentar la inyectabilidad de las pastas y mejorar su cohesión<sup>[14]</sup>.

Finalmente, el agregar quitosán a los CPC resulta atractivo gracias a sus propiedades para aumentar la biocompatibilidad de las pastas.

## PROPUESTA Y OBJETIVOS

Debido a las características de biocompatibilidad que presenta el quitosán, así como su fácil obtención, resulta de gran interés su investigación como aditivo en la preparación de CPC.

En este proyecto se propone analizar el efecto que tiene el agregar pequeñas cantidades de quitosán a un cemento basado en  $\alpha$ -TCP previamente diseñado en el Laboratorio de Biomateriales del IIM. La utilización de esta formulación base sin quitosán (C0) fue seleccionada debido a los resultados obtenidos durante su proceso de hidratación<sup>[8]</sup> y con el propósito de mantener una línea de investigación dentro del equipo de trabajo.

De esta forma, se establecieron los siguientes objetivos de trabajo:

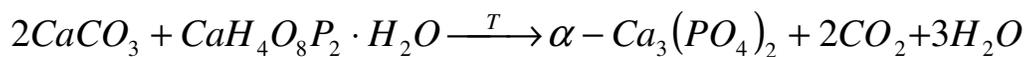
- Obtener un método práctico para adicionar quitosán en diferentes cantidades al cemento base C0.
- Proponer formulaciones con diferentes cantidades de quitosán con el fin de evaluar sus propiedades básicas.
- Realizar un seguimiento de las propiedades básicas (tiempos de reacción, morfología cristalina y resistencia mecánica) de dichas formulaciones a lo largo de la reacción de cementación en un tiempo no mayor a 30 días.

## MÉTODO EXPERIMENTAL

### Obtención de la fase sólida

#### $\alpha$ -TCP

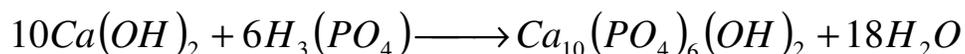
La síntesis del  $\alpha$ -TCP se realizó a partir de cantidades estequiométricas de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) y dihidrógeno fosfato de calcio monohidratado ( $\text{CaH}_4\text{O}_8\text{P}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) mediante la siguiente reacción en estado sólido:



El tratamiento térmico requerido consistió en una rampa de calentamiento inicial durante 30 minutos hasta alcanzar los 700°C, esta temperatura se mantuvo durante 2 horas, posteriormente se volvió a calentar hasta los 1250°C en un tiempo de 45 minutos para mantenerse así 12 horas. Finalmente se realizó un templado sobre una placa de cobre previamente enfriada para retener la fase  $\alpha$  deseada.

## HA

La hidroxiapatita (HA) fue obtenida por la técnica de vía húmeda mediante la siguiente reacción<sup>[12]</sup>:



Los reactivos fueron mezclados en cantidades estequiométricas. La mezcla se dejó reposar dos semanas hasta alcanzar un pH de 8.4, para posteriormente filtrarse y calcinarse a 850°C durante tres horas.

## Molienda

Con el fin de tener un mejor control en la velocidad de la reacción, es deseable tener una distribución pequeña de tamaño de partícula; además de un polvo fino para optimizar las velocidades de reacción. Para esto se recurrió a la molienda de los polvos del cemento.

Tanto el  $\alpha$ -TCP como la HA fueron molidos por separado en un molino planetario de bolas (Retsch PM100). Este molino se programó con un cambio en la dirección de giro cada 15 segundos, a una velocidad de 400rpm. El procedimiento consistió en moler cada 15gr de polvo con bolas de ágata de 2cm de diámetro durante 2 horas para reducir el tamaño de partícula y posteriormente con bolas de ágata de

1cm de diámetro durante otras 2 horas para disminuir la distribución del tamaño.

Para verificar que el proceso fuese óptimo, los polvos molidos fueron cribados en un tamiz con apertura de 20 $\mu$ m. Posteriormente una muestra del polvo fue observada en microscopio electrónico (MEB) para tener una mejor apreciación del tamaño de partícula promedio manejado en el proyecto.

## Mezcla de polvos

La mezcla homogénea (ver figura 11) de los componentes de la fase sólida se realizó mediante agitación ultrasónica (Branson, 1510) con la ayuda de una pequeña cantidad de acetona durante 10 a 15 minutos. El uso de acetona se debió a que los fosfatos de calcio no reaccionan con solventes orgánicos pero si con soluciones acuosas.



Los polvos fueron pesados en cantidades de 5gr (99% de  $\alpha$ -TCP y 1% de HA) para cada mezcla.

Posteriormente fueron secados en una mufla a 60°C por 20 horas. Esta mezcla de polvos constituye la fase sólida de todos los cementos preparados.

## **Fase líquida**

La fase líquida del cemento está compuesta por una solución 0.6 M de fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), y una solución 1 M de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )<sup>[8]</sup>. Debido a que estas soluciones contienen sales inorgánicas disueltas, esta fase líquida actúa también como un acelerador de la reacción de fraguado.

## **Quitosán**

El quitosán utilizado en este proyecto (Sigma C3646) es procedente de caparazones de cangrejo. Los datos del fabricante especifican un 85% mínimo de desacetilación, y la presentación viene en forma de hojuelas, por lo que fue necesario realizar una molienda. Debido a que el quitosán tiene una consistencia similar a la de un acetato, la utilización del molino de bolas no fue viable, por lo que en su lugar se utilizó una batidora de aspas manual (Braun MR400) para reducir el

tamaño de las hojuelas a un polvo semifino pasado por un tamiz de 0.5 x 0.32 mm (ver figura 12).



**Figura 12.** Quitosán molido y en hojuelas.

Para la adición del quitosán al cemento se realizaron varias pruebas, con el fin de desarrollar un método efectivo para lograr una pasta homogénea y con buena manejabilidad. Dichas pruebas serán explicadas con detalle en el capítulo siguiente.

Como resultado se obtuvieron tres soluciones con cantidades distintas de quitosán, como se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3.** Soluciones de quitosán

Solución	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> [1M] (ml)	Quitosán (gr)
LC5	10	0.05
LC10	10	0.10
LC15	10	0.15

## Formulación de los cementos

Con el fin de comparar el efecto del quitosán en las propiedades del biocemento, se propusieron tres formulaciones diferentes además de una sin quitosán.

Las diferentes formulaciones de cemento estuvieron basadas en el cemento sin quitosán, el cual tiene en su fase líquida cantidades iguales de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  [0.6M] y  $\text{CaCl}_2$  [1M], con una relación líquido/polvo (L/P) de 0.55ml/gr<sup>[8]</sup>. Al momento de añadir las soluciones de quitosán fue necesario modificar esta relación L/P para lograr una pasta homogénea. Las formulaciones finales se muestran en la tabla 4.

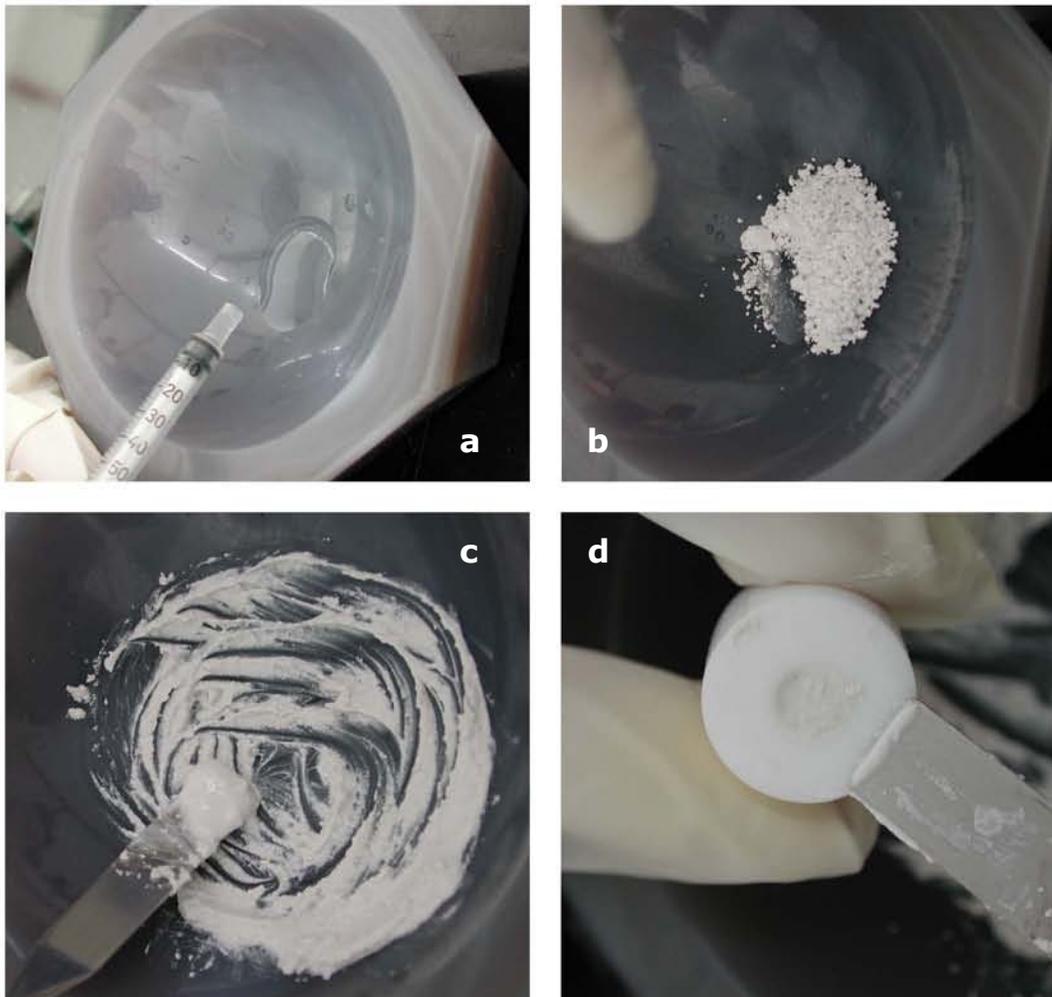
**Tabla 4.** Formulaciones de los CPC.

Cemento	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ [0.6M]	$\text{CaCl}_2$ [1M]	LC5	LC10	LC15	L/P (ml/gr)
C0	0.28	0.28	-	-	-	0.56
C5	0.24	0.24	0.4	-	-	0.88
C10	0.20	0.20	-	0.4	-	0.80
C15	0.20	0.20	-	-	0.4	0.80

El criterio para ajustar la relación L/P fue la manejabilidad de la pasta, la cual consiste en garantizar una completa humectación de la fase sólida con la menor cantidad de líquido posible<sup>[16]</sup>, esto con el fin de obtener una pasta moldeable y sin grumos.

De esta forma se partió de la formulación cemento C0 más una cantidad fija de solución de quitosán, la cual quedó establecida en 0.4 ml/gr por ser el volumen de líquido que, por inspección visual al

momento de preparar los cementos, incorporaba homogéneamente a toda la pasta del cemento previamente formado. Sin embargo la cantidad de líquido total resultó ser muy alta, por lo cual se disminuyó poco a poco la cantidad de las soluciones base ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{CaCl}_2$ ) hasta alcanzar la mínima que formara una pasta manejable. Estas variaciones se realizaron conservando la relación 1:1 entre dichas soluciones, y manteniendo la cantidad de solución de quitosán fija entre las tres formulaciones para fines comparativos (tabla 4).



**Figura 13.** Preparación de las pastas: a. fase líquida, b. adición de la fase sólida, c. mezcla y d. moldeo

La preparación de las pastas se realizó dentro de un mortero de ágata añadiendo el polvo a la fase líquida y mezclando con una espátula durante un minuto hasta incorporar totalmente las dos fases (ver figura 13).

Posteriormente las probetas necesarias para cada prueba se moldearon dentro de moldes de teflón sobre una placa de vidrio y cuidando de no dejar burbujas de aire en su interior.

Este procedimiento se realizó a temperatura ambiente, y el tiempo promedio en el que se prepararon las pastas y se moldearon fue de 3 minutos.

## **Caracterización de las pastas**

Los ensayos que se realizaron tuvieron la finalidad de comparar propiedades de tiempos de reacción y resistencia mecánica de los cementos en función del quitosán agregado. De esta forma las variables a analizar fueron: tiempo de cohesión, tiempos de fraguado tanto inicial como final, resistencia mecánica, composición química y morfología cristalina resultante.

Los tiempos de reacción fueron medidos a partir del momento en que el polvo entra en contacto con el líquido. Para el tiempo de cohesión se hizo una inspección visual al sumergir una pastilla de 10mm de diámetro por 5mm de alto en fluido fisiológico simulado a 37°C, y se consideró que la pasta había alcanzado su tiempo de cohesión cuando la pastilla no se desintegraba. Aunque no existe una norma que proporcione una metodología para determinar este tiempo de reacción, el procedimiento

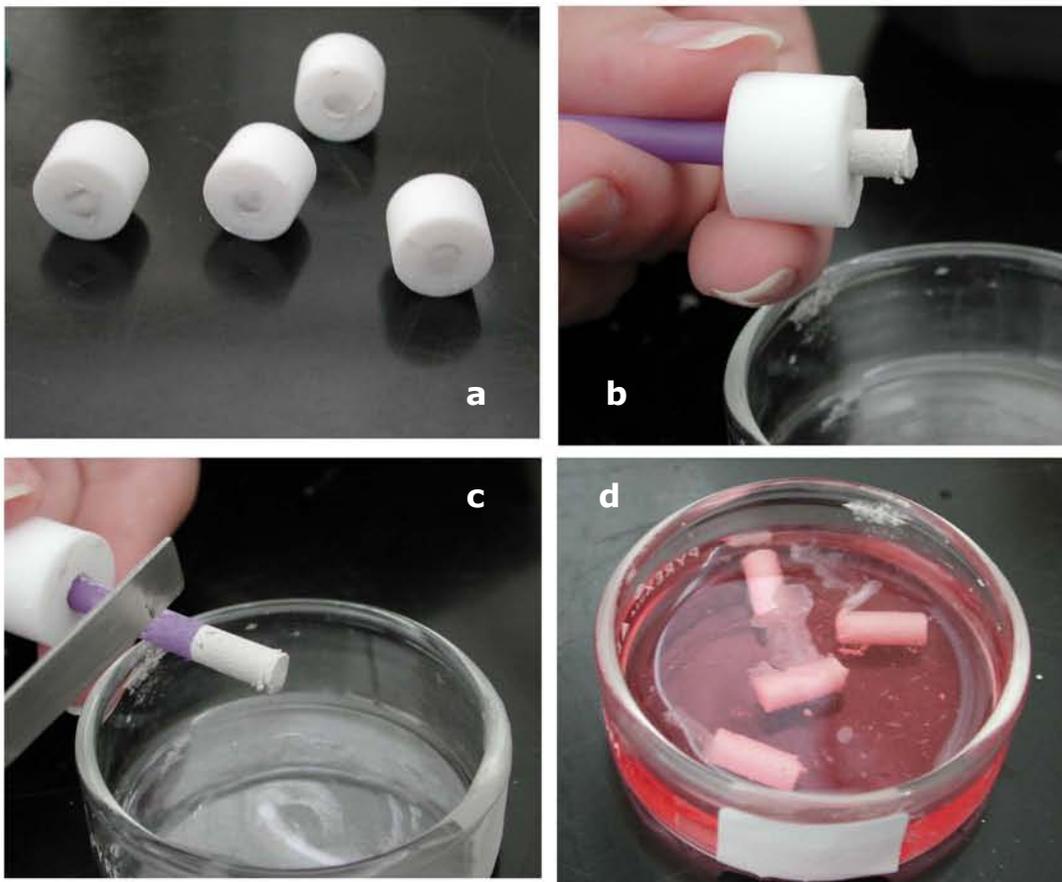
seguido fue basado en el descrito por *Fernández et al*<sup>[38]</sup>, en el cual se preparan pastillas de dichas dimensiones (5 x 10 mm) en un tiempo de un minuto, posteriormente se sumerge una en medio fisiológico conservando las demás en seco a temperatura ambiente; de forma visual se determina si la pastilla sumergida no sufre desintegración, de lo contrario se sumerge una segunda pastilla la cual ha reposado un tiempo determinado. Este proceso continúa hasta que el cemento presenta cohesión.



**Figura 14.** Equipo de agujas de Gillmore

Los tiempos de fraguado inicial y final fueron medidos mediante el método de agujas de Gillmore, el cual fue descrito anteriormente. La pasta fue preparada en moldes de 10mm de diámetro por 13mm de alto, y se midió el tiempo necesario transcurrido para que al colocar cada aguja, ésta no dejara ninguna marca sobre la superficie del cemento.

Posteriormente se realizaron ensayos de compresión a diferentes tiempos (1, 3, 7, 14 y 28 días) para hacer un estudio de la evolución de la resistencia mecánica de los cementos en función del quitosán agregado. Para esta prueba se utilizó una máquina universal Instron 5500R con una velocidad de desplazamiento del cabezal de 1mm/min, y se prepararon probetas de 5mm de diámetro por 10mm de alto las cuales fueron sumergidas en fluido fisiológico simulado a 37°C durante los respectivos tiempos de análisis (ver figura 15). Para cada cemento y cada tiempo se prepararon un total de 8 probetas con el fin de realizar pruebas a por lo menos 4 ó 6 de ellas.



**Figura 15.** Preparación de probetas: a. espera, b y c. desmolde y d. reposo en fluido fisiológico

La evolución química de los cementos se analizó mediante difracción de rayos X, para lo cual se utilizaron las probetas ensayadas a compresión, de forma que este análisis también correspondió a los tiempos establecidos para el seguimiento del estudio. Los compuestos a analizar fueron el  $\alpha$ -TCP de partida y la HA esperada como producto final, así como los productos intermedios de reacción fosfato octacálcico (OCP) y brushita (DCPD).

De igual forma se observó la morfología cristalina de las probetas fracturadas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

Finalmente se hizo un seguimiento de los efectos de las pastas en el medio implantado haciendo una medición del pH del fluido fisiológico donde se sumergieron las probetas.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las diferentes caracterizaciones realizadas a los CPC formulados en este proyecto ayudaron a comprender el efecto de la adición de quitosán en diferentes proporciones. En este capítulo se presentan los resultados obtenidos y se hace un análisis de ellos.

### **Adición del quitosán**

Con el fin de obtener un método efectivo para agregar el quitosán al cemento base, se analizaron tres posibles formas de adición: en forma de polvo, en solución con la fase líquida del cemento y en forma de líquido como una tercera solución.

Al momento de evaluar la adición del quitosán en la fase sólida en forma de polvo, se observó que difícilmente se lograba formar una pasta homogénea y moldeable, es decir, se obtuvo una pasta rígida y grumosa debida principalmente a la poca humectabilidad y solubilidad del quitosán. De esta forma, esta posibilidad se eliminó.

Como segunda opción se intentó obtener una solución de quitosán utilizando la fase líquida del cemento ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{CaCl}_2$ ), de forma que en una pequeña cantidad de líquido (10 ml) se agregó un poco de polvo de quitosán (0.10 gr), con el propósito de obtener una solución viscosa con la cual preparar el cemento. Sin embargo esto no fue posible, ya que la fase líquida no logró disolver el quitosán, obteniendo únicamente la precipitación del polvo añadido.

Debido a esto, se decidió que lo más sencillo era realizar una tercera solución líquida para el cemento, la cual incluyera el quitosán.

Recordando que el quitosán sólo es soluble en soluciones con pH menores a 7 se consideraron diferentes ácidos para preparar las soluciones, escogiendo finalmente el ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) por contener grupos fosfato iguales a los del cemento. La concentración de la solución ácida utilizada quedó ajustada en 1 molar de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , a partir de la cual se prepararon tres soluciones diferentes de quitosán (tabla 3), cada una con una viscosidad diferente proporcional a la cantidad de polvo añadido.

Las cantidades de quitosán se escogieron a partir de una cantidad pequeña (0.10 gr) debido a que resulta difícil preparar soluciones a altas concentraciones, ya que con el aumento de viscosidad del líquido aumentan las fuerzas iónicas del quitosán, limitando así su solubilidad<sup>[31]</sup>.

**Tabla 3.** Soluciones de quitosán

Solución	$\text{H}_3\text{PO}_4$ [1M] (ml)	Quitosán (gr)
LC5	10	0.05
LC10	10	0.10
LC15	10	0.15

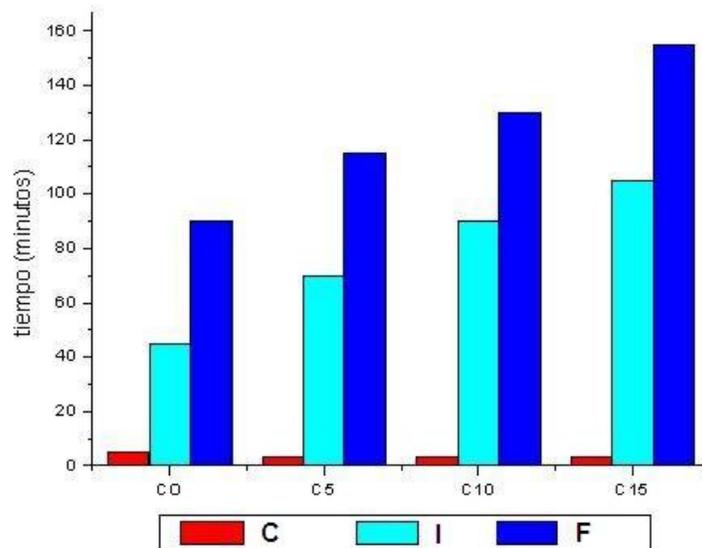
## Tiempos de reacción

Los resultados obtenidos al medir los tiempos de reacción de cada pasta mostraron claramente el efecto del quitosán añadido, éstos se presentan a continuación en la tabla 4 y la figura 16.

**Tabla 4.** Tiempos de reacción

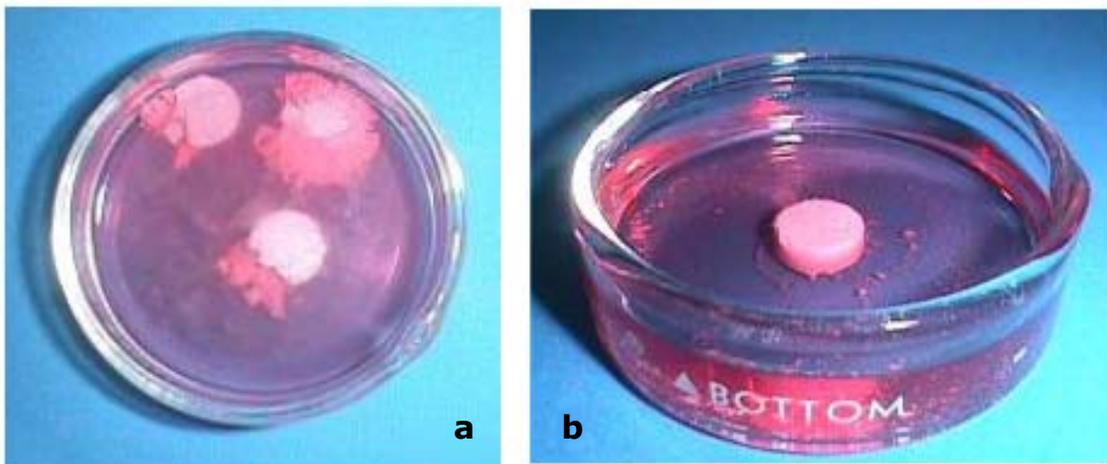
	C0	C5	C10	C15
Cohesión (C)	5	< 3	< 3	< 3
Fraguado inicial (I)	45	70	90	105
Fraguado final (F)	90	115	130	155
Fraguado (F - I)	45	45	40	50

Tiempo en minutos



**Figura 16.** Tiempos de reacción (cohesión y fraguado) de las diferentes pastas preparadas.

En el caso de los cementos con quitosán se pudo observar un ligero incremento en la consistencia de cada pasta según el aumento de quitosán, presentando una buena cohesión desde el momento en el que se mezclaron las fases líquido y polvo, por lo cual se determinó que su tiempo de cohesión está por debajo de los tres minutos requeridos para preparar y moldear cada pasta. Esta prueba fue realizada por inspección visual, un ejemplo de estos resultados se puede ver en la figura 17.



**Figura 17.** Prueba de cohesión, a. cemento C0 antes de tener cohesión, b. cemento presentando cohesión al sumergirse en fluido fisiológico simulado.

Por otro lado la adición de quitosán produjo un incremento en los tiempos inicial y final de fraguado. Esto corresponde a los datos bibliográficos<sup>[38]</sup> que explican el efecto al añadir pequeñas cantidades de quitosán, cuyas partículas se adsorben a la superficie de las partículas de fosfatos de calcio, retardando así el crecimiento de cristales de brushita (DCPD).

Sin embargo el tiempo de fraguado total, es decir, el tiempo transcurrido desde que la pasta comienza a fraguar hasta que termina, prácticamente no se vio alterado, lo cual indica que el efecto del

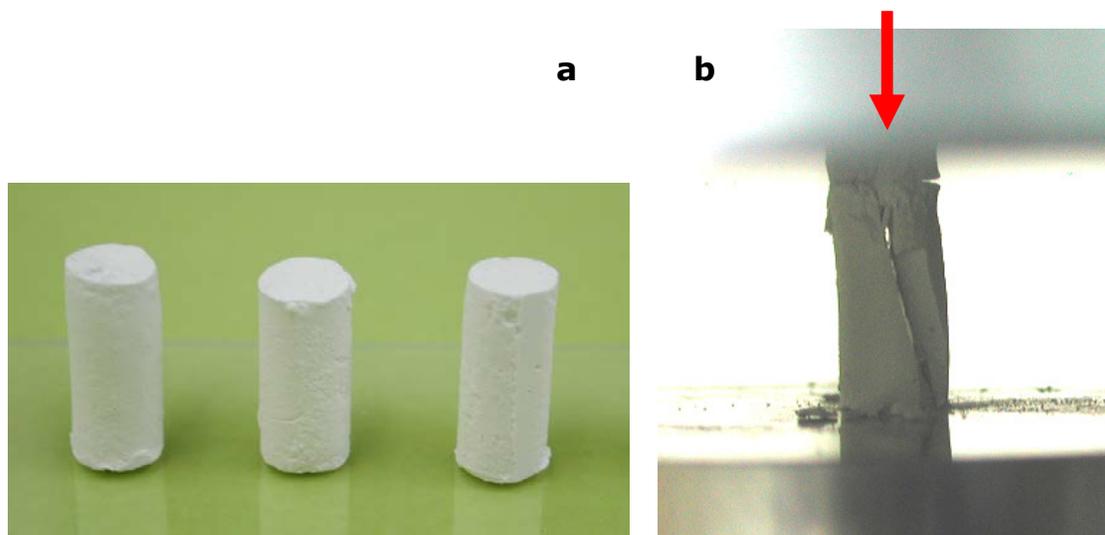
quitosán se encuentra principalmente en el inicio de la reacción de fraguado.

## Resistencia mecánica

A partir de las pruebas de compresión se obtuvieron resultados de módulo de elasticidad (E) y resistencia a la fractura para cada cemento en los diferentes tiempos de análisis.

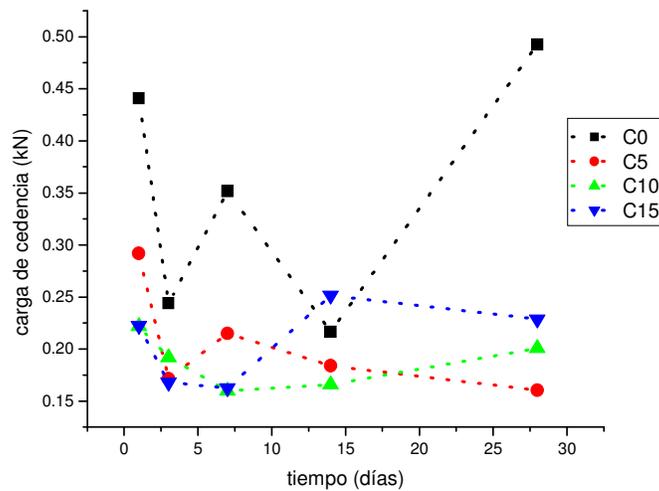
Los resultados de las cargas soportadas por cada cemento indican cambios en la resistencia del material a lo largo del tiempo, esto es debido a la evolución química de cada pasta.

El tipo de fractura que se presentó en todos los cementos fue frágil y longitudinal, es decir en la dirección de aplicación de la carga (ver figura 18).

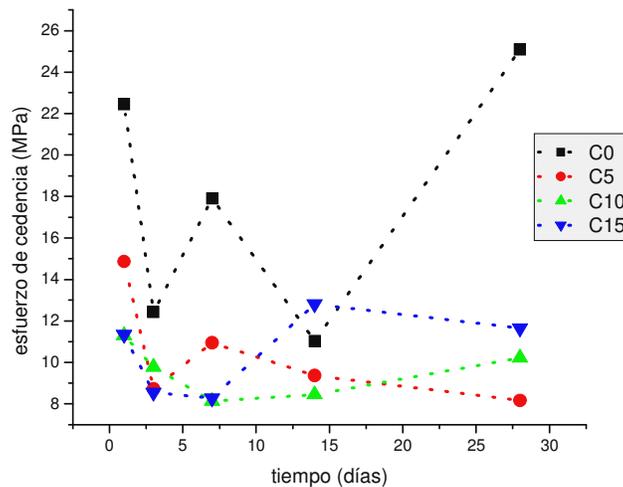


**Figura 18.** a. probetas antes de fracturar y b. fractura durante el ensayo a compresión

La carga de cedencia de cada material se refiere a la carga que éste soporta antes de sufrir una primera fractura, el esfuerzo de cedencia es el esfuerzo presentado a esta carga. Estos resultados (ver figuras 19 y 20) muestran que a excepción de las pruebas realizadas a los 14 días desde la preparación de los cementos, el C0 es quien presenta una mayor resistencia a la compresión, siendo considerablemente más alta a los 28 días. Los demás cementos de igual forma presentan variaciones de resistencia a lo largo del tiempo, aumentando con respecto al inicio para los cementos C10 y C15, y disminuyendo para el cemento C5.



**Figura 19.** Carga de cedencia en función del tiempo.



**Figura 20.** Esfuerzo de cedencia en función del tiempo.

Estas variaciones en la resistencia indican posibles cambios tanto en el aspecto químico como en la estructura de las pastas y el producto cementante. A lo largo del tiempo la reacción de cementación se completa disolviendo por completo el  $\alpha$ -TCP y precipitando cristales de HA, en donde se requiere alcanzar la estabilidad termodinámica necesaria para lograr el crecimiento de dichos cristales. Cuando estas condiciones no son suficientes, los cristales de HA que se han formado se vuelven a disolver con el fin de bajar la energía interna del sistema y permitir así su nueva formación. Estas disoluciones de los productos formados pueden reflejarse en los cambios de la resistencia mecánica, como se puede apreciar en la disminución al inicio del estudio para finalmente alcanzar una mayor estabilidad con la formación final de HA. Sin embargo es necesario hacer un estudio de los compuestos formados a lo largo del tiempo para confirmar la explicación de estos cambios con la evolución química de los cementos.

La carga máxima y el esfuerzo máximo se refieren a la carga y el esfuerzo soportados hasta la fractura total del material. Estos valores no corresponden en todos los puntos a la resistencia de cedencia debido a que los cementos presentaron en algunas ocasiones pequeñas fracturas iniciales que no lograron deshacer la forma del material, permitiéndole seguir soportando cargas incluso mayores. Sin embargo, al momento de considerar estas propiedades para el diseño del biomaterial, deben tomarse como válidos los valores de cedencia, ya que son las cargas mínimas a las cuales los cementos presentan fracturas.

Se puede observar que a pesar de estas diferencias, la resistencia máxima de los cementos presenta casi el mismo comportamiento que su resistencia a la cedencia (ver figuras 21 y 22), con una disminución inicial de las propiedades mecánicas entre 3 y hasta 14 días después de la preparación de los cementos, para finalmente aumentar, siendo el

cemento sin quitosán (C0) el que presentó la mayor resistencia con una diferencia considerablemente alta con respecto de las demás pastas.

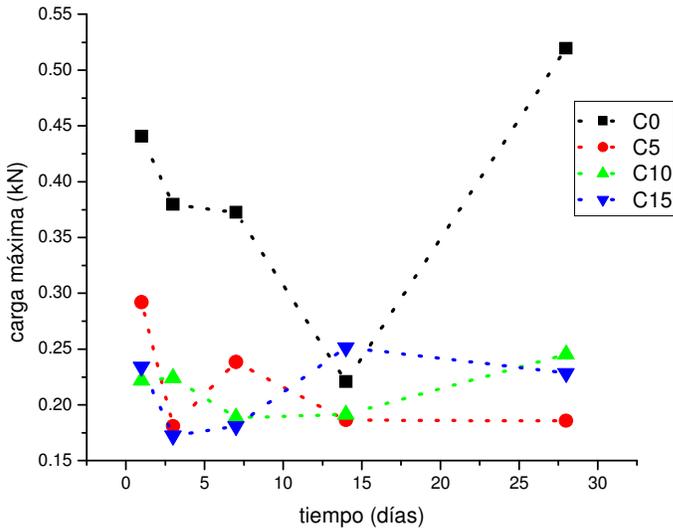


Figura 21. Carga máxima en función del tiempo.

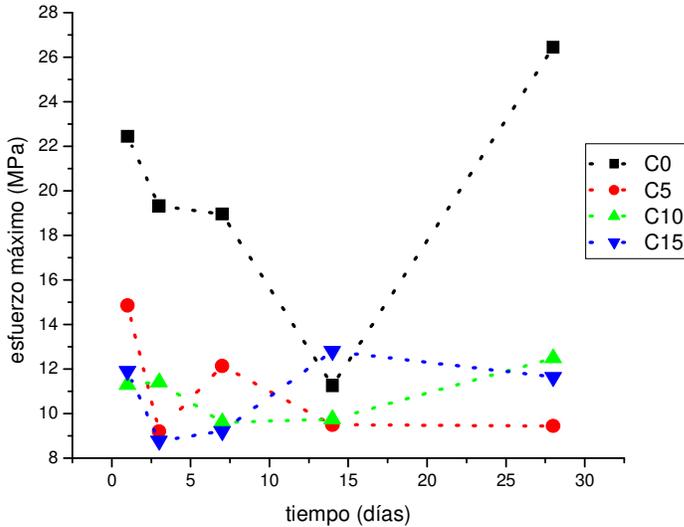
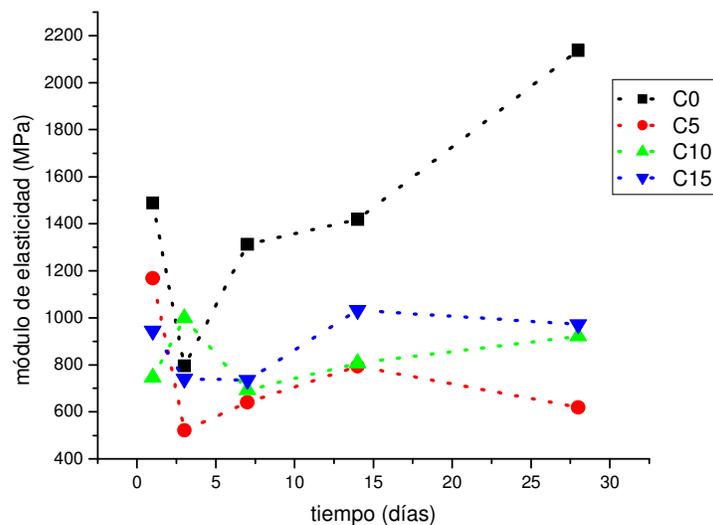


Figura 22. Esfuerzo máximo en función del tiempo.



**Figura 23.** Módulo de elasticidad E en función del tiempo.

El módulo de elasticidad (E) o módulo de Young representa el comportamiento del material al recibir una carga, y es descrito por la pendiente de la curva esfuerzo-deformación en su zona elástica<sup>[39]</sup>, de forma que al momento de hacer el ensayo a compresión se calculó estimando el valor esta pendiente en su tramo recto. Así un módulo de elasticidad elevado corresponde a un material que requiere de cargas grandes para ser deformado, mientras que un módulo de elasticidad bajo se relaciona con un material que a cargas pequeñas presenta una gran deformación.

Los resultados obtenidos (ver figura 23) muestran una disminución de las propiedades mecánicas en todas las pastas con quitosán con respecto al cemento base C0, siendo bastante significativa al tiempo final del análisis. Sin embargo la adición de quitosán no disminuye de forma proporcional estas propiedades, ya que el cemento con las propiedades más bajas es el C5, el cual tiene la menor cantidad de quitosán añadido. Esto puede ser explicado por un aumento en la viscosidad de las pastas al añadir mayor cantidad de quitosán,

aumentando las fuerzas de cohesión entre las partículas y obteniendo estructuras más densas.

Sin embargo el efecto del quitosán no es únicamente el de aumentar la cohesión del cemento, ya que la resistencia mecánica tuvo una disminución significativa. Esto indica que el quitosán agregado a diferentes cantidades tiene un efecto sobre las propiedades básicas de los cementos, probablemente afectando a la forma en la que se realiza la reacción de cementación o bien a la forma de la estructura final del producto obtenido.

A pesar de las diferencias entre las pastas con y sin quitosán, el comportamiento de todas ellas parece ser el mismo, disminuyendo su módulo de elasticidad al principio de la reacción para después aumentar.

De esta forma, para comprender mejor este efecto del quitosán en los CPC, es necesario recurrir a los resultados conseguidos del seguimiento de la reacción mediante el análisis de compuestos por difracción de rayos X, así como a las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB).

## **Evolución química**

El seguimiento de los productos de reacción obtenidos a lo largo de los tiempos de análisis ayudó a observar el efecto del quitosán en las propiedades del cemento.

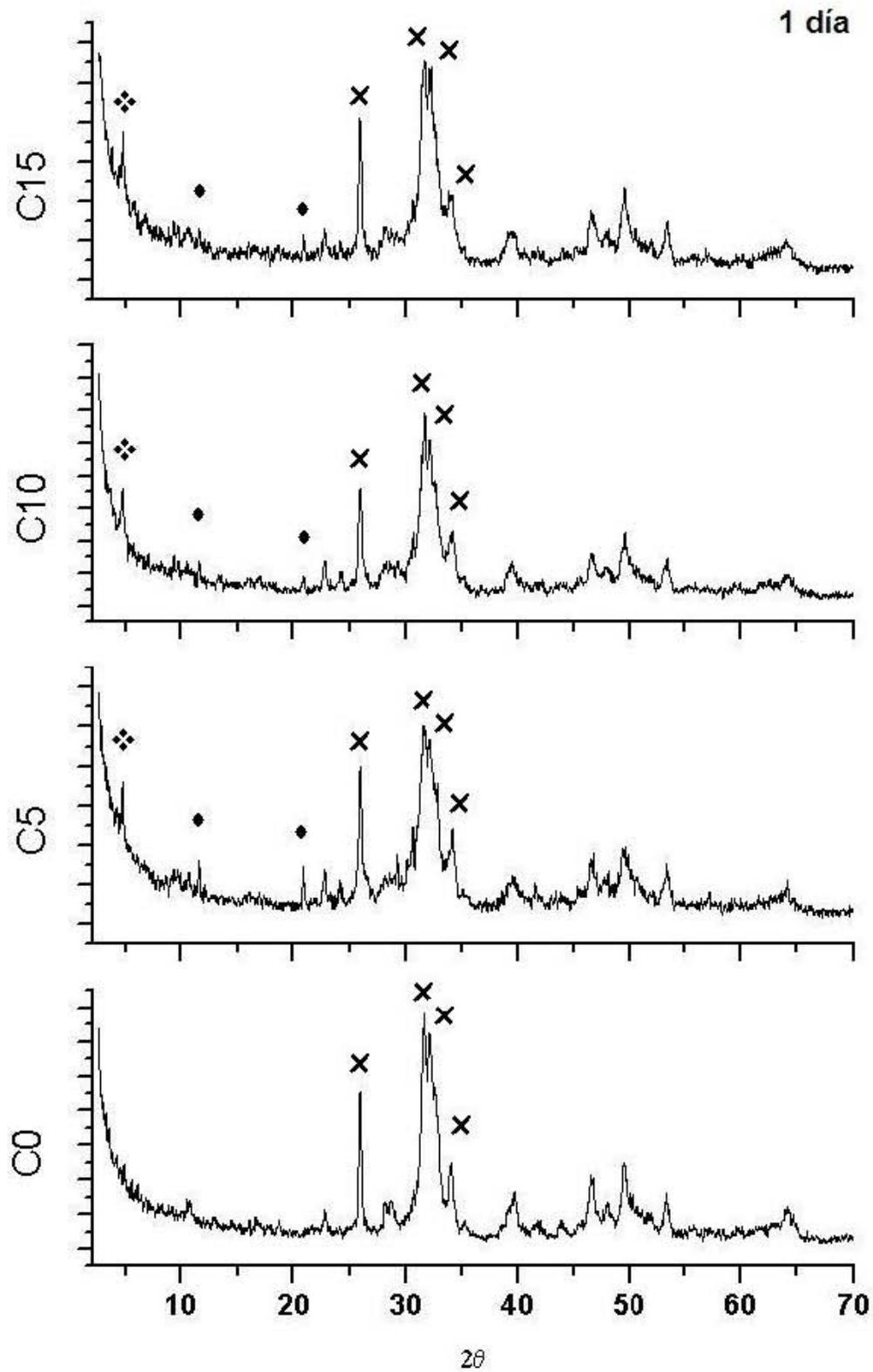
En los patrones de difracción de rayos X se observa que en el cemento sin quitosán C0 se obtiene HA como único producto de reacción desde el primer día de análisis (ver figura 24), manteniéndose este

único compuesto durante todo el tiempo de análisis (ver figuras 24 a 28 – C0). Esto explica sus altas propiedades mecánicas con respecto a los otros cementos.

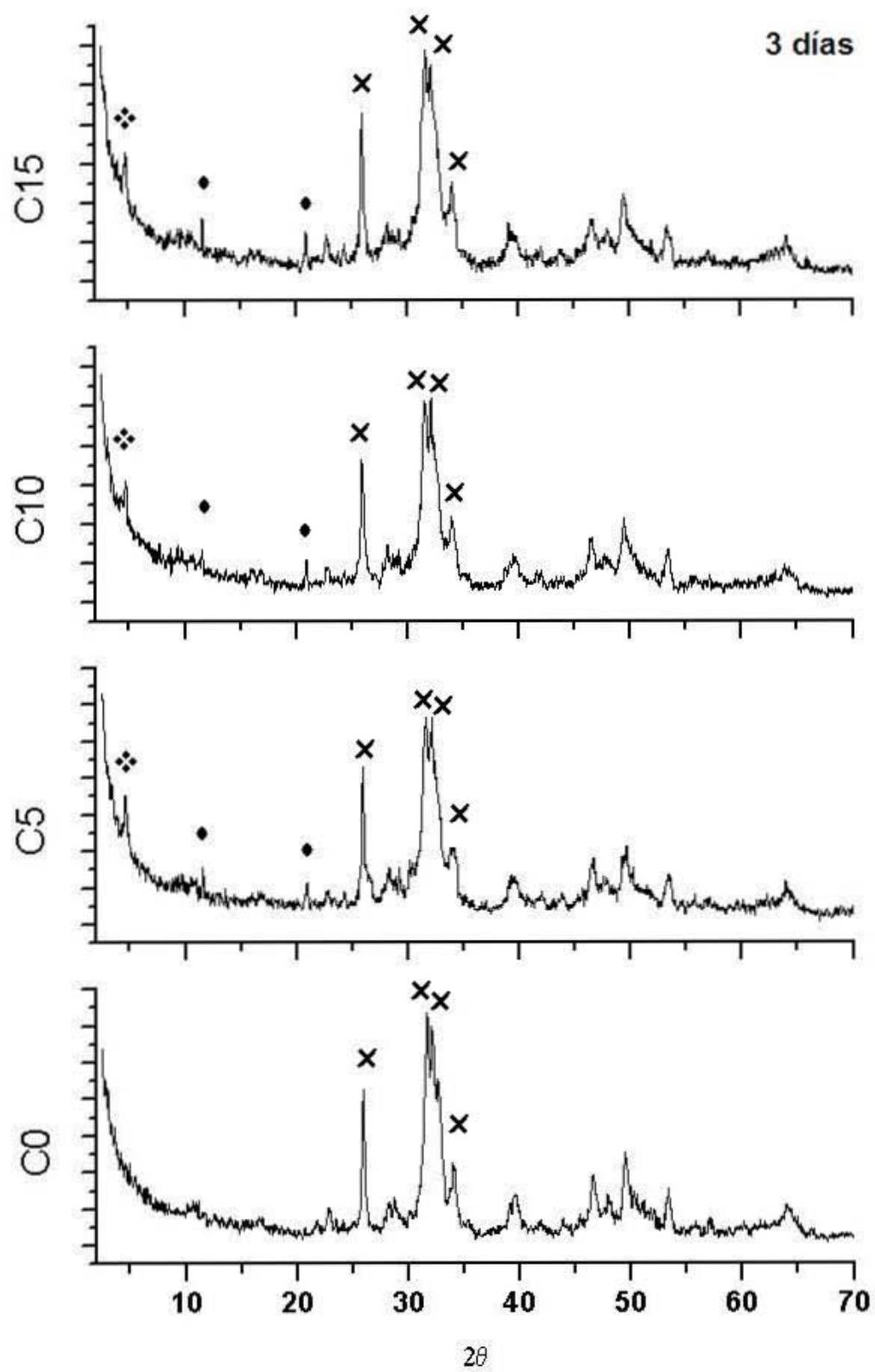
En los cementos con quitosán se pueden observar además los picos característicos de brushita (DCPD) y fosfato octacálcico (OCP), compuestos reportados como intermedios antes de la formación de HA. La cantidad de DCPD en los cementos varía a lo largo del tiempo, aumentando ligeramente a los 3 y 7 días, tiempos a los que corresponden la disminución de sus propiedades mecánicas (ver figuras 25 y 26), lo cual confirma la reabsorción de los cristales formados para alcanzar la estabilidad termodinámica necesaria para su crecimiento, disminuyendo de esta forma la energía interna del sistema.

Una vez que estas condiciones se alcanzan, la cantidad de DCPD disminuye, como se puede ver a los 14 días (ver figura 27) hasta finalmente desaparecer, ya que a los 28 días del análisis no se detecta la presencia de este compuesto (ver figura 28). El cemento que presenta mayores variaciones de brushita (DCPD) es el C5, lo que indica que la presencia de esta fase está relacionada con las bajas propiedades mecánicas del material.

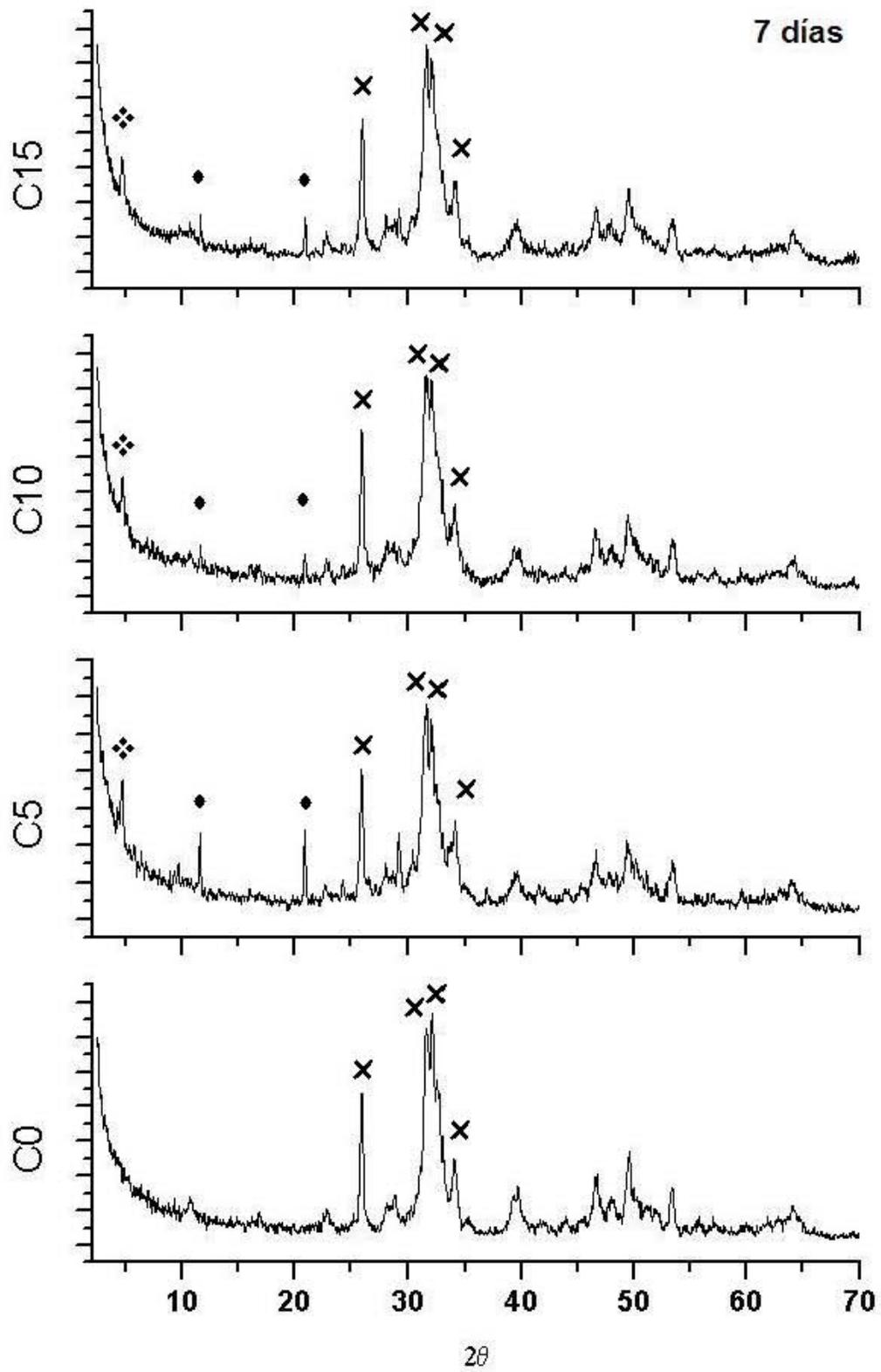
Las variaciones de OCP en los cementos con quitosán no son visibles hasta los 28 días, donde comienza a disminuir, de modo que el cemento con menor cantidad es el C15 (ver figura 28). De esta forma se puede ver que la adición de quitosán tiene un efecto en la reacción de cementación, ya que los cementos a los que se les agregó el biopolímero tuvieron un retraso en la evolución química del producto presentando los productos intermedios de reacción. La presencia de estos compuestos se ve reflejada de forma directa en la resistencia mecánica de cada material.



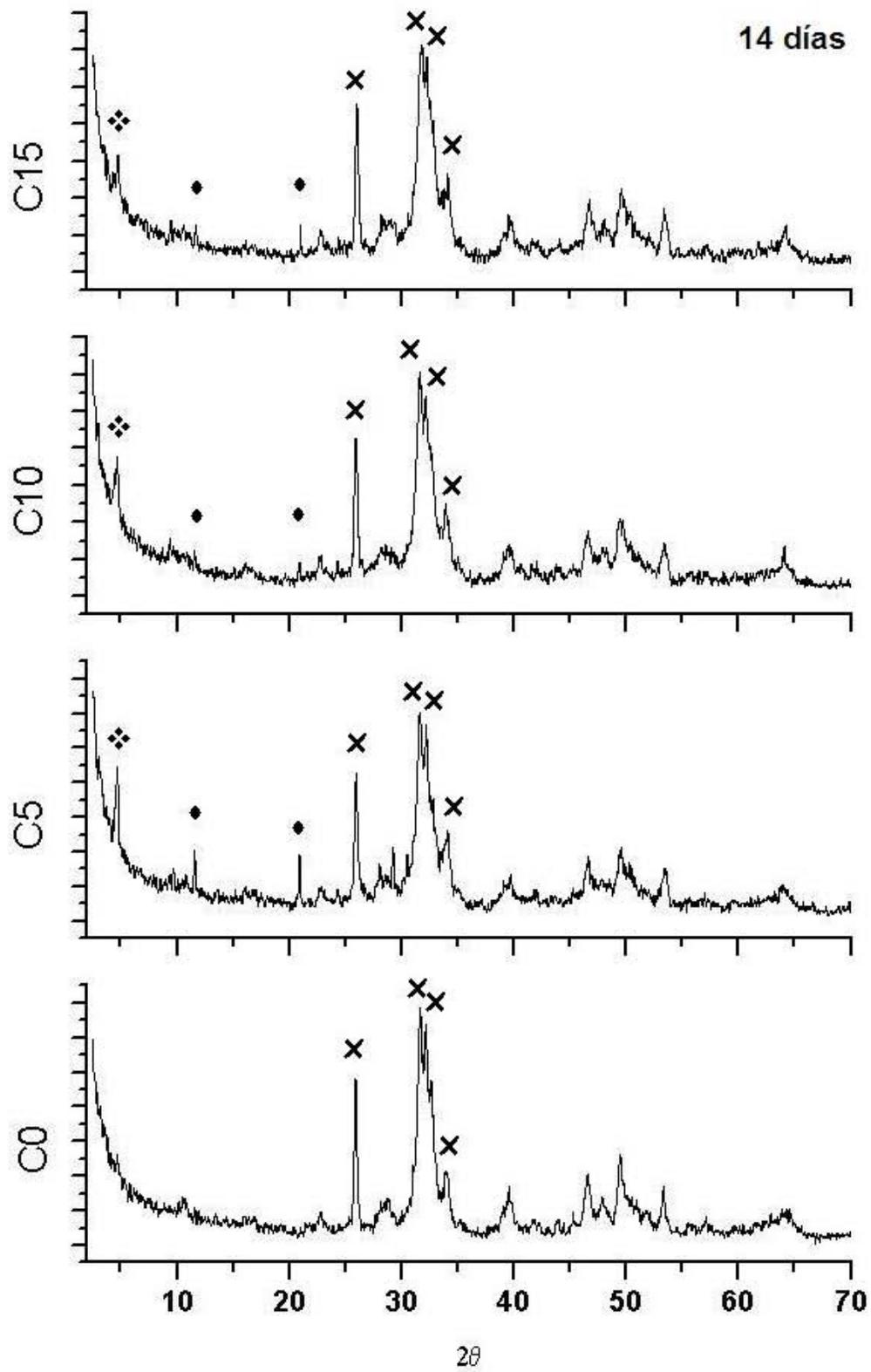
**Figura 24.** Patrón de difracción a 1 día de preparación de las pastas.  
 ♦ OCP, • DCPD, X HA.



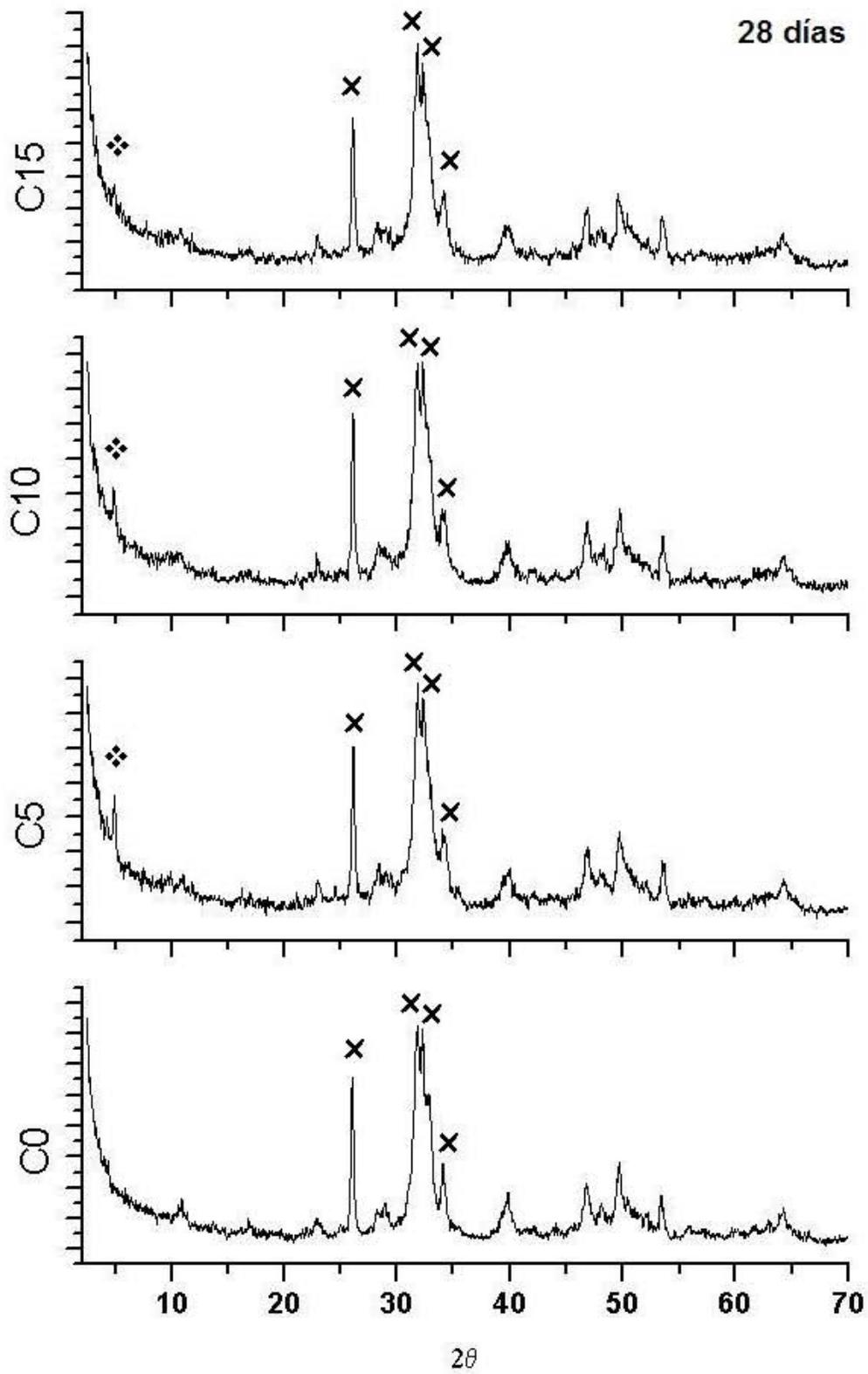
**Figura 25.** Patrón de difracción a 3 días de preparación de las pastas.  
 ♦ OCP, • DCPD, X HA.



**Figura 26.** Patrón de difracción a 7 días de preparación de las pastas.  
 ♦ OCP, • DCPD, X HA.



**Figura 27.** Patrón de difracción a 14 días de preparación de las pastas.  
 ♦ OCP, • DCPD, X HA.



**Figura 28.** Patrón de difracción a 28 días de preparación de las pastas.  
 ♦ OCP, • DCPD, X HA.

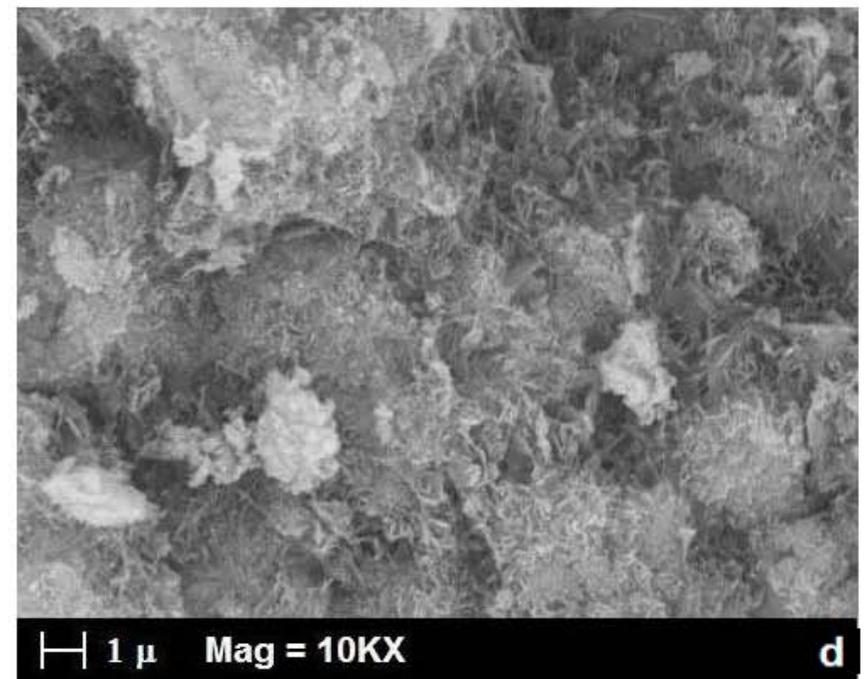
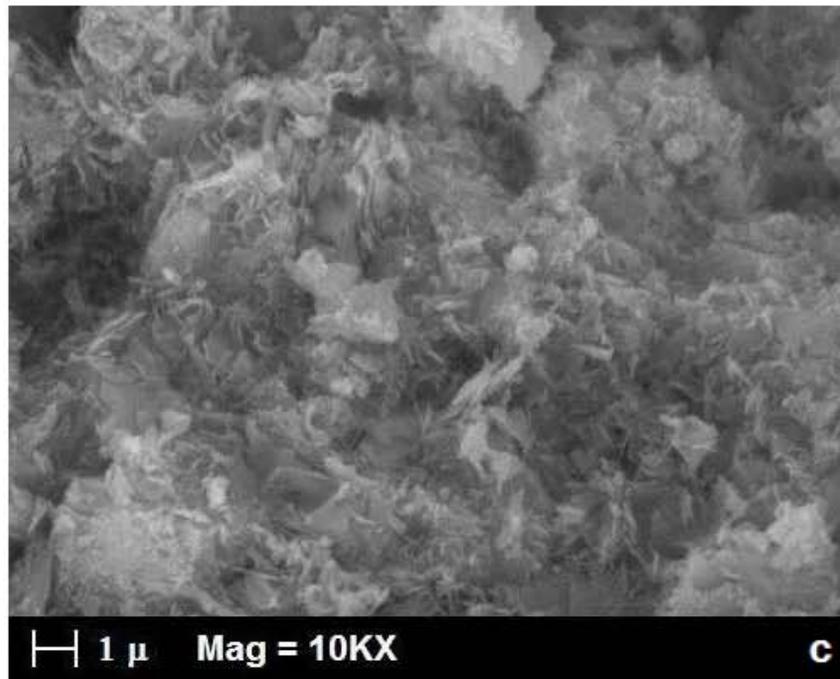
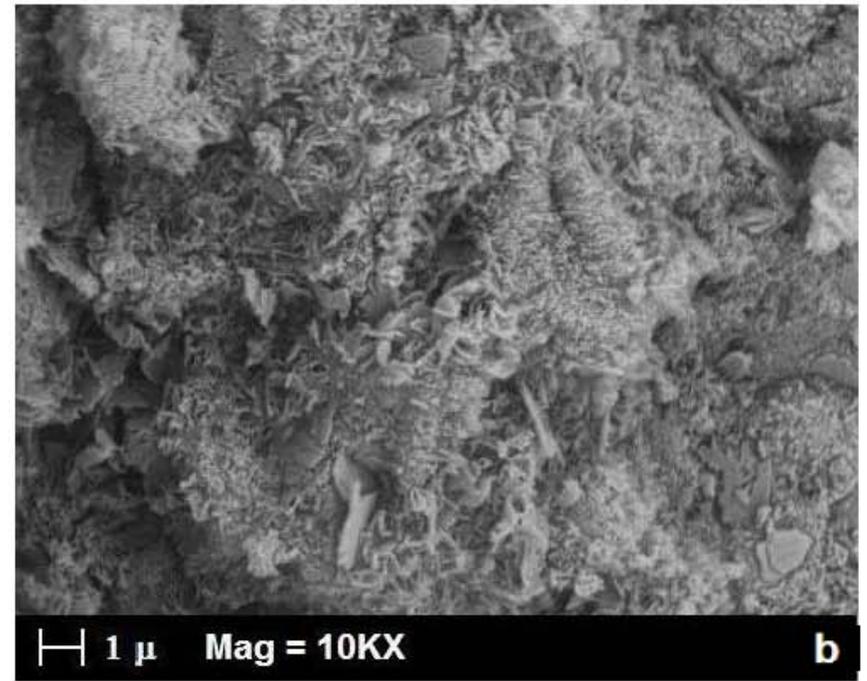
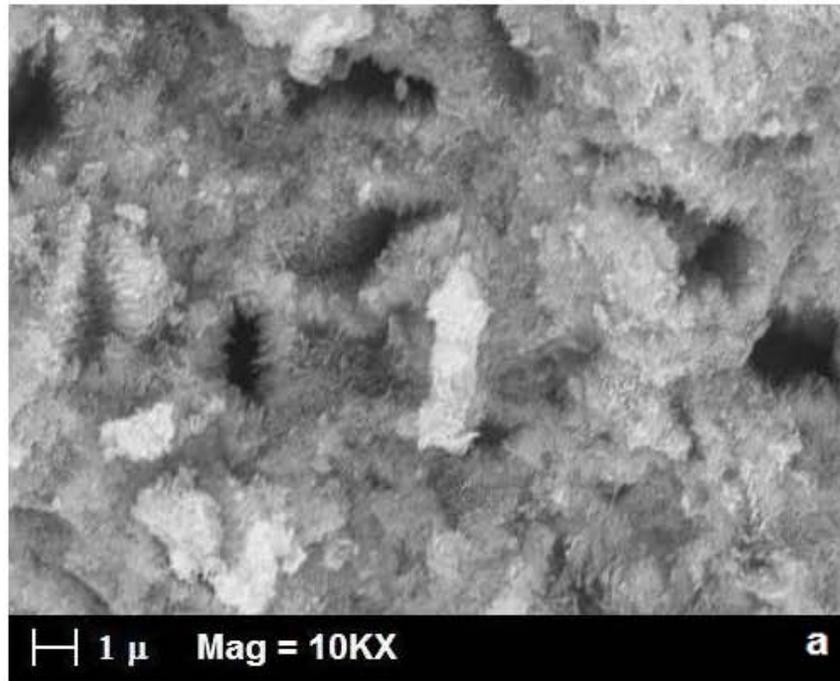
## Microestructura

El análisis en MEB de la morfología cristalina muestra la relación entre el tamaño de cristal y las propiedades mecánicas.

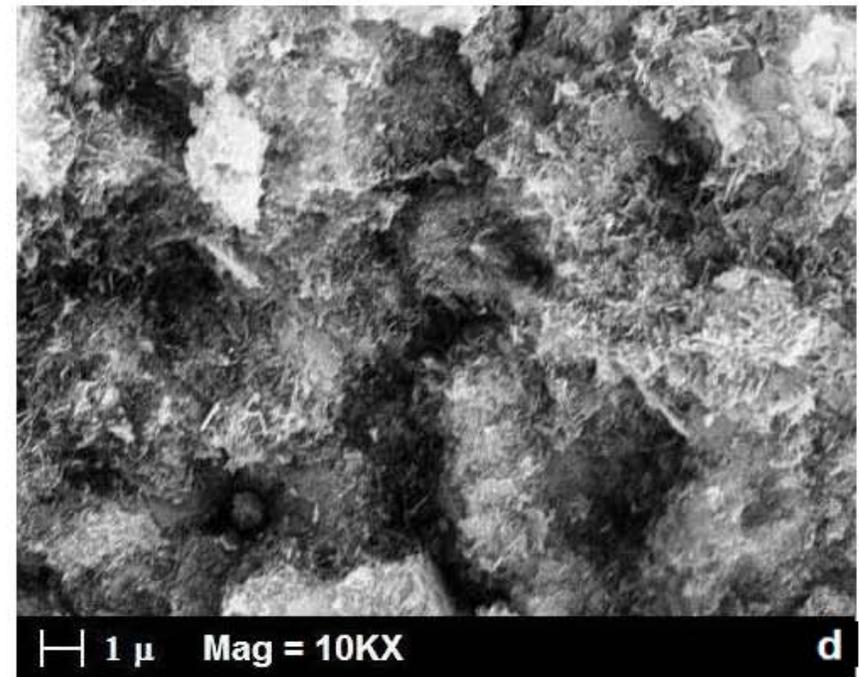
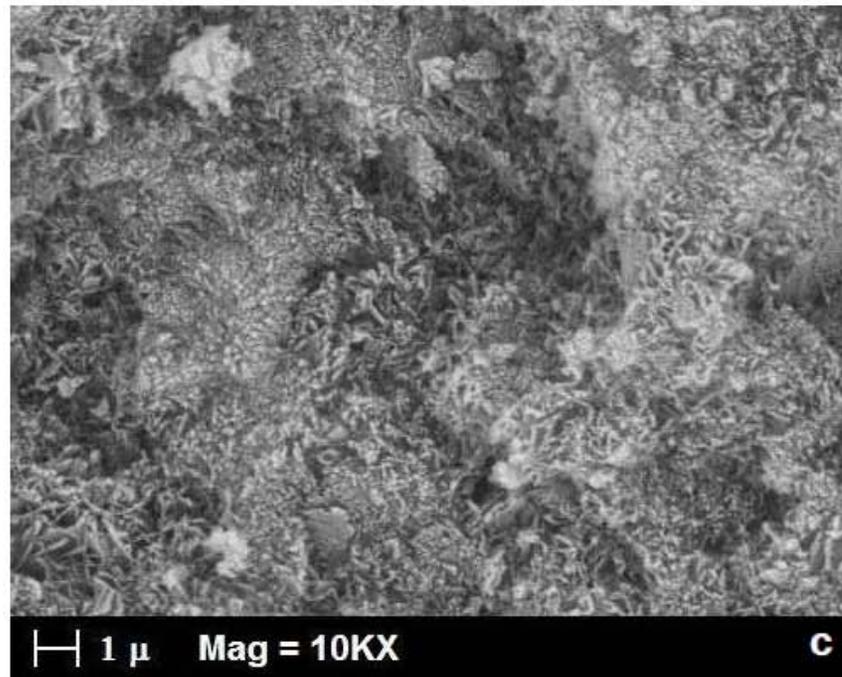
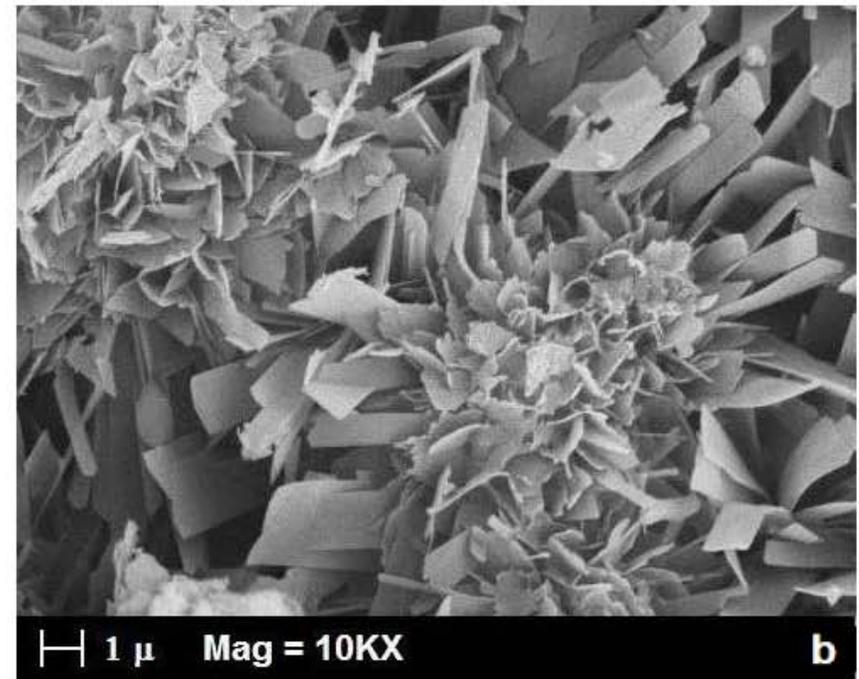
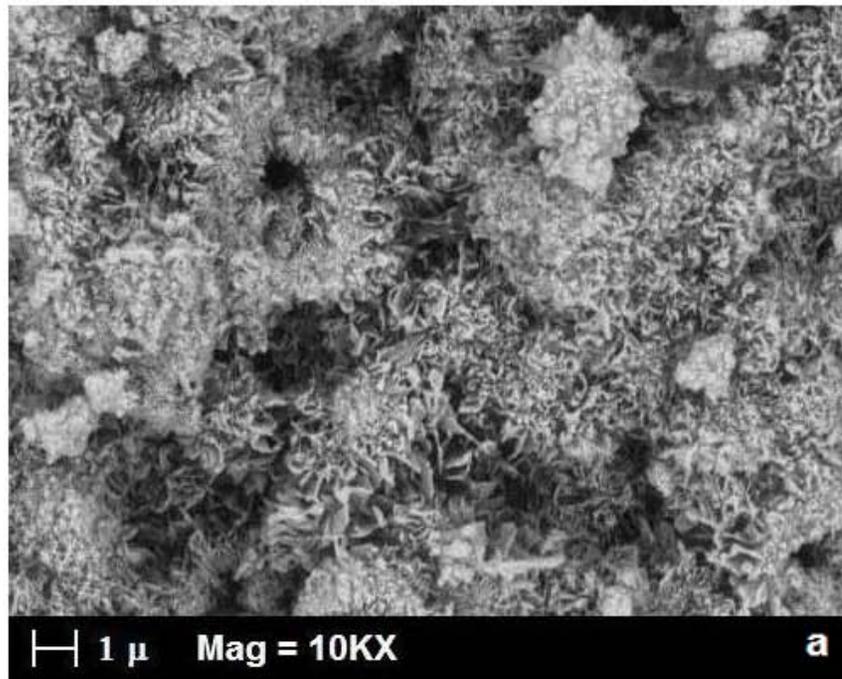
De esta forma se puede observar que el cemento C5, el cual tuvo la resistencia más baja, es el que forma cristales más grandes, mientras que el C0 forma cristales pequeños, siendo el más resistente.

En un principio (ver figura 29) se pueden observar estructuras pequeñas pero poco definidas. En las micrografías a los 3 días (ver figura 30) se puede apreciar un notable crecimiento en el tamaño de los cristales, con una clara forma de placas u hojuelas, en especial para el cemento C5; a partir de este tiempo la estructura cristalina disminuye su tamaño con esta estructura definida aumentando así las propiedades mecánicas de los cementos. Estos cambios están relacionados tanto con las variaciones en las propiedades mecánicas como con la evolución de los compuestos químicos a lo largo de la reacción de cementación.

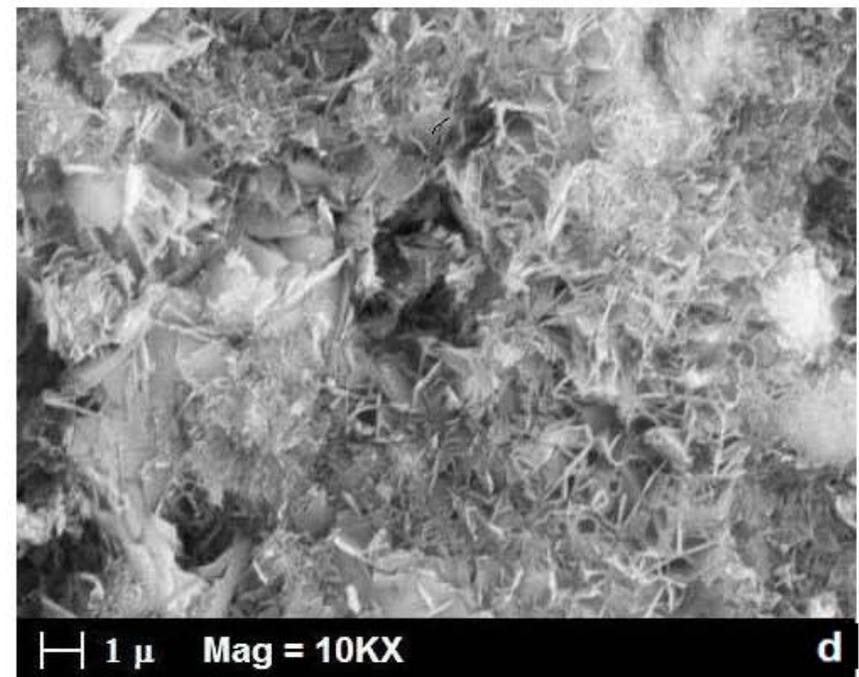
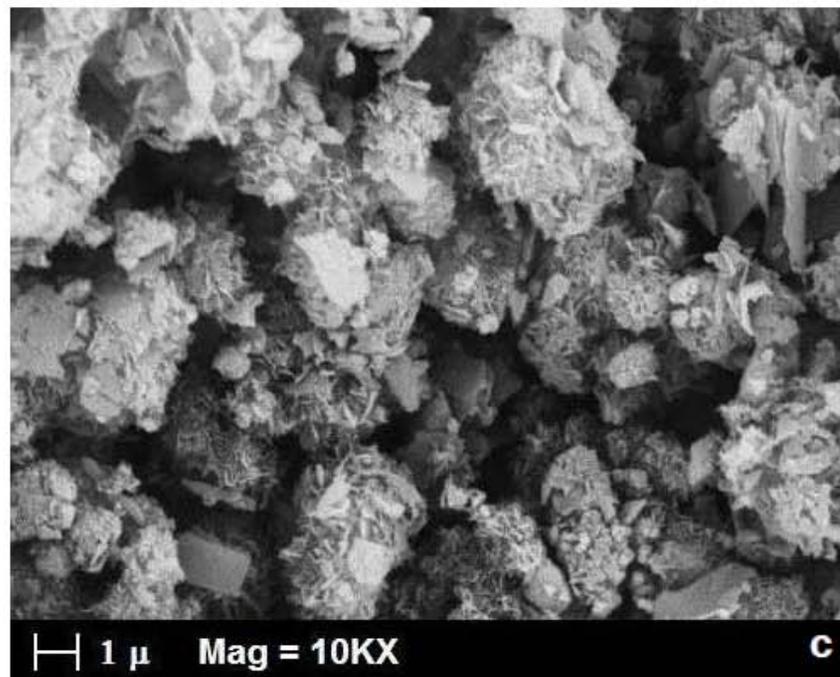
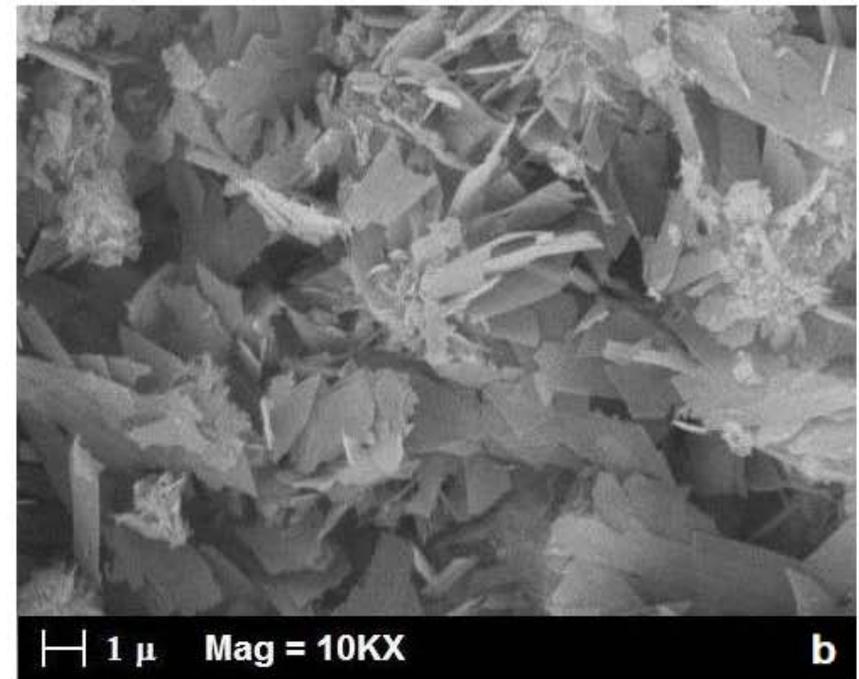
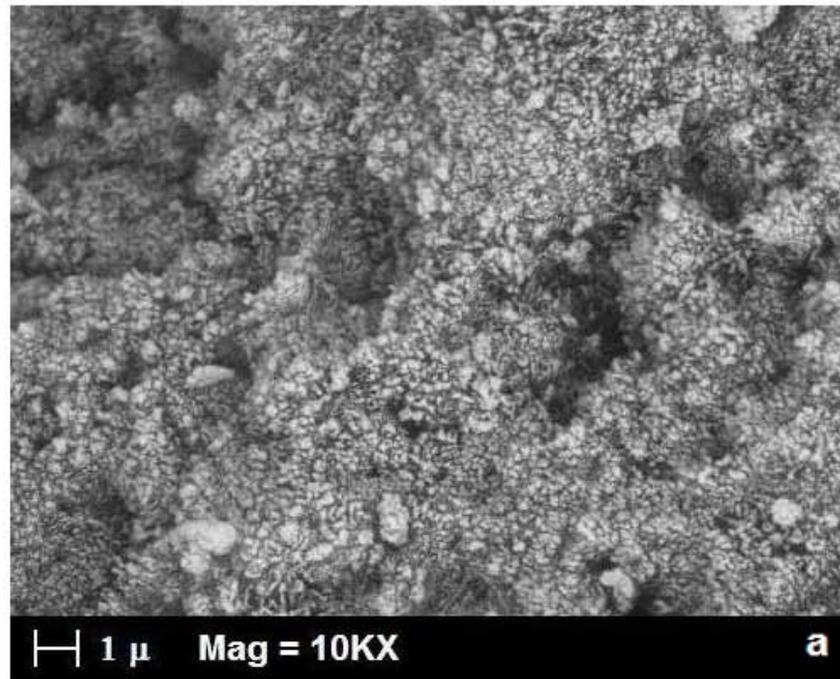
El cemento C0 es quien presenta una estructura más ordenada, en un arreglo de placas en ordenamientos de forma circular que se densifica a lo largo del tiempo (ver figuras 29 a 33 - a). De esta forma su estructura pareciera ser la de agujas en vez de placas, ya que en su mayoría estas placas están vistas de forma lateral. Por su parte los cementos con quitosán presentan un orden menor en arreglo de estas estructuras cristalinas, haciéndose evidente para el cemento C5 donde el acomodo asemeja los pétalos de una flor en donde las placas se orientan en todas las direcciones a partir de un punto central (ver figuras 30 a 32 - b).



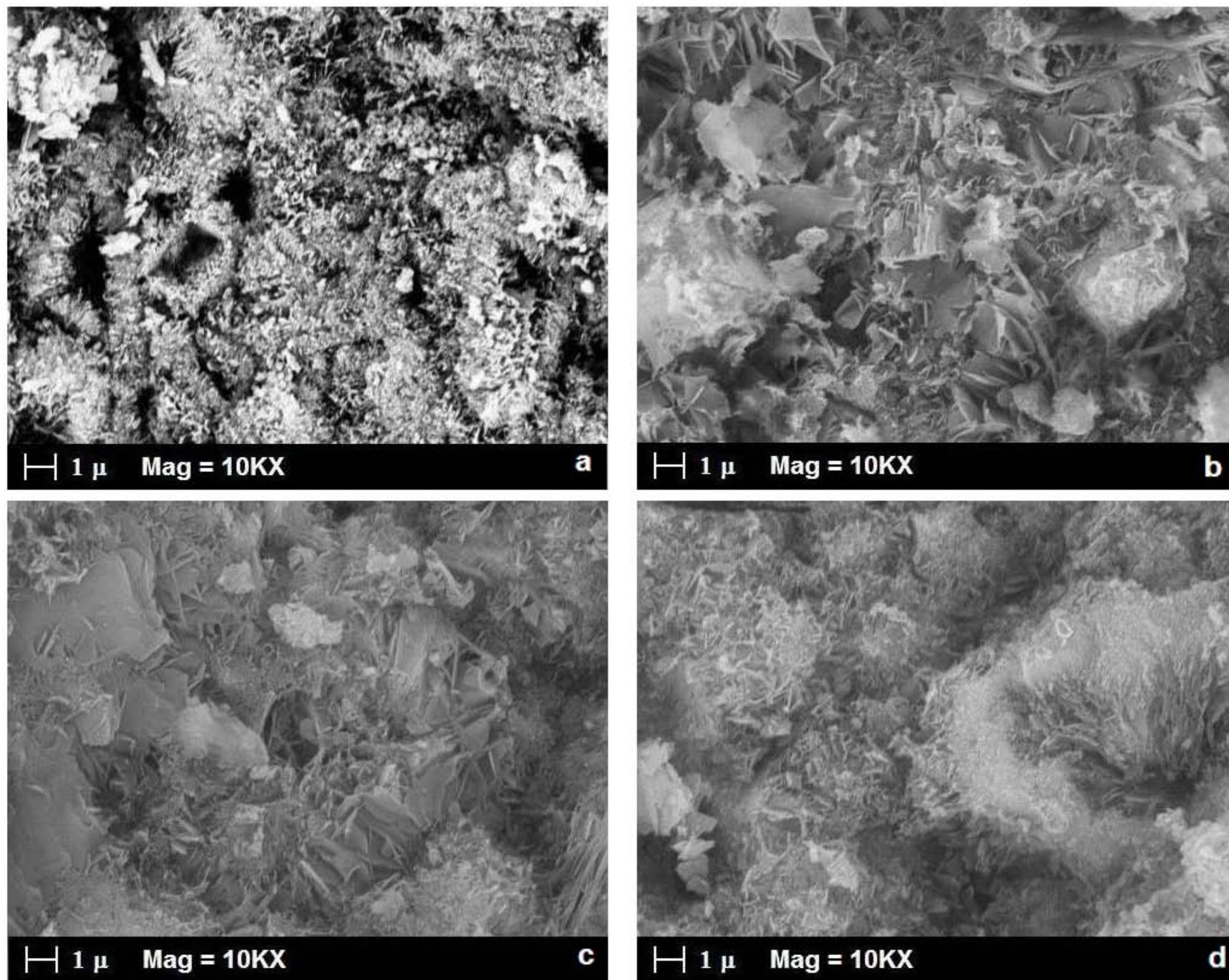
**Figura 29.** Imágenes de microscopía (MEB) a 1 día de preparación. a = C0, b = C5, c = C10 y d = C15.



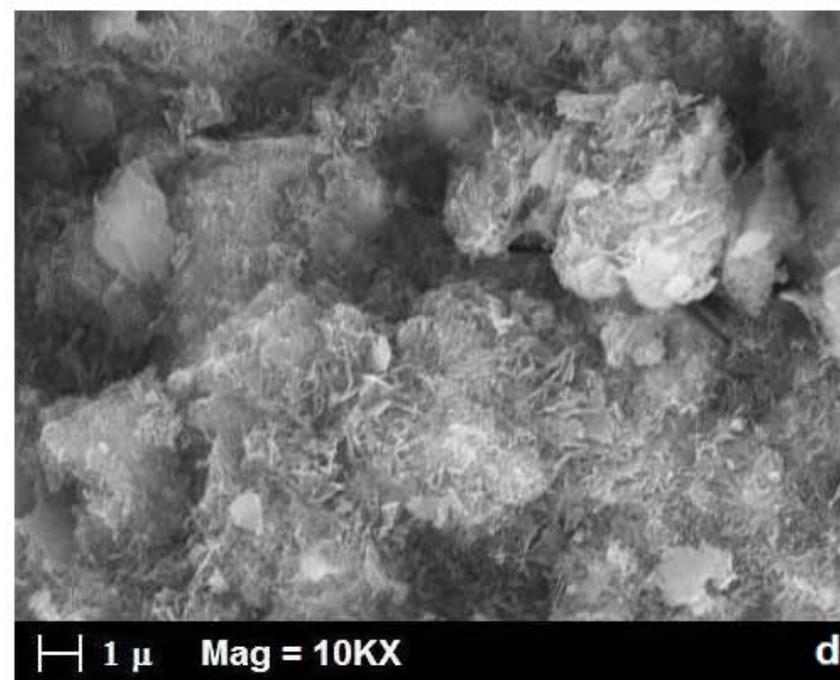
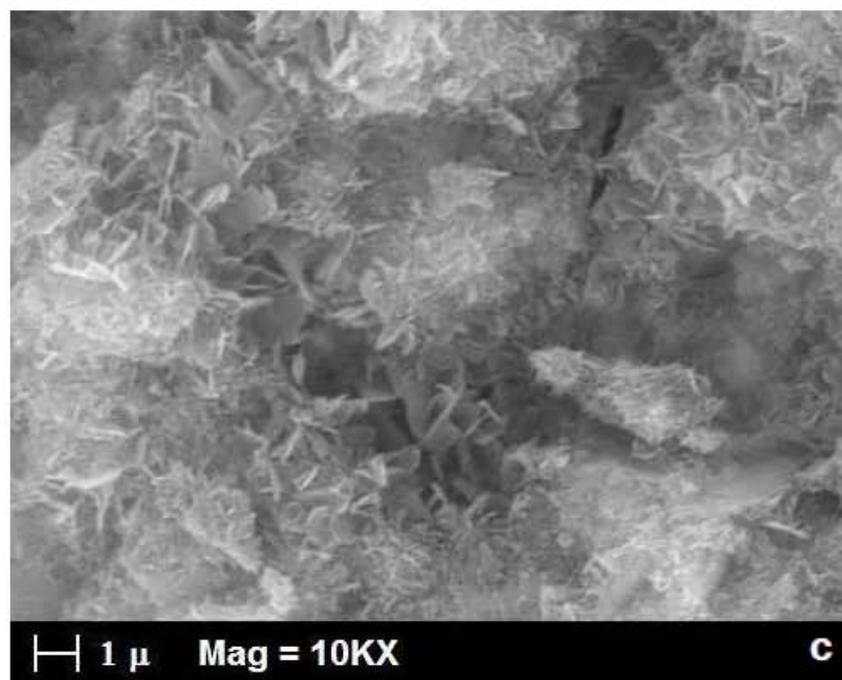
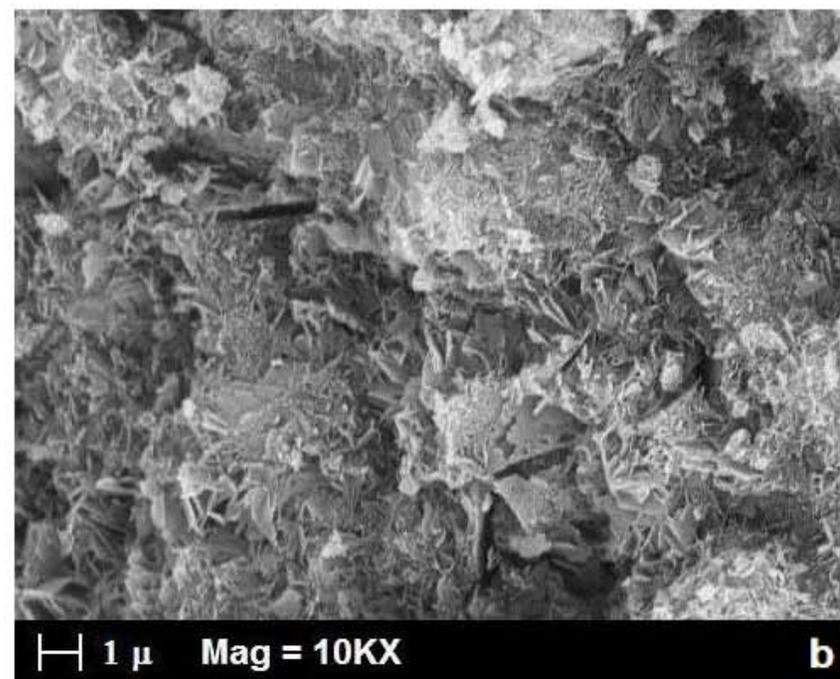
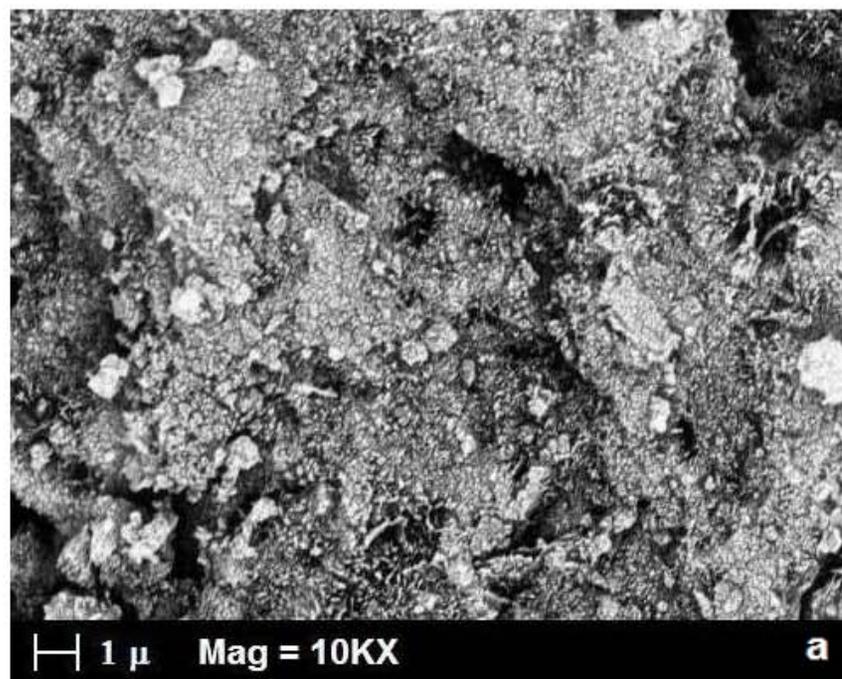
**Figura 30.** Imágenes de microscopía (MEB) a 3 días de preparación. a = C0, b = C5, c = C10 y d = C15.



**Figura 31.** Imágenes de microscopía (MEB) a 7 días de preparación. a = C0, b = C5, c = C10 y d = C15.



**Figura 32.** Imágenes de microscopía (MEB) a 14 días de preparación. a = C0, b = C5, c = C10 y d = C15.



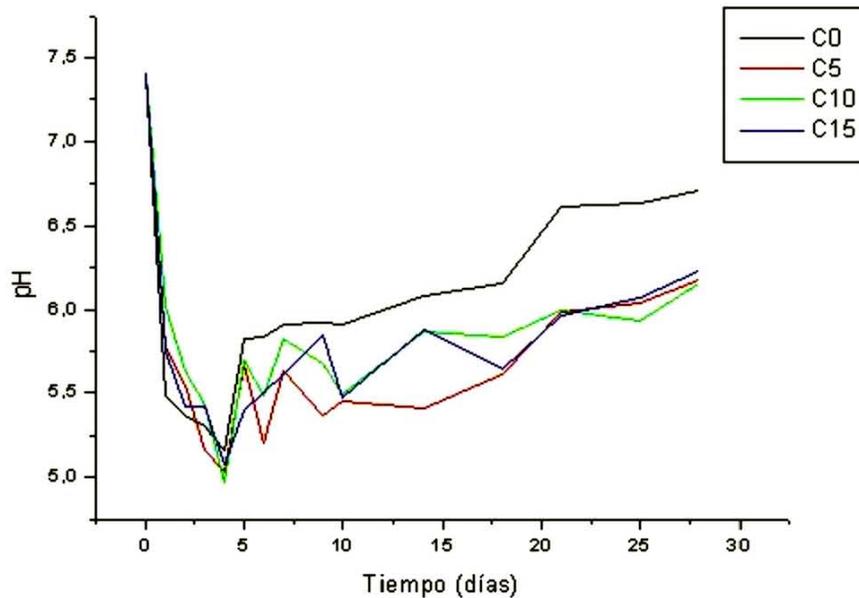
**Figura 33.** Imágenes de microscopía (MEB) a 28 días de preparación. a = C0, b = C5, c = C10 y d = C15.

Los cementos C10 y C15 forman una especie de grumos o cúmulos (ver figuras 30 a 32 – c y d) que aumentan de tamaño hasta volverse una estructura más homogénea (ver figura 33 – c y d). Estos agregados están formados por conjuntos de pequeñas placas, las cuales con la evolución de la reacción disminuyen de tamaño y se ordenan en una dirección, comenzando a parecerse a las micrografías del cemento C0 a los 3 días de preparación (ver figuras 30 – a y 33 – c y d).

## **Medición de pH**

La medición del pH del fluido fisiológico en el cual se sumergieron las probetas de los cementos se realizó cada tercer día, cambiando este líquido por uno nuevo con el fin de simular de alguna forma la renovación del medio en el cual se encuentra un implante en el cuerpo gracias al torrente sanguíneo.

Los resultados obtenidos muestran una tendencia de todos los cementos a disminuir el pH en los primeros 3 días de reacción, tiempo que corresponde a las propiedades mecánicas más bajas, lo cual indica que es el tiempo en el que ocurren cambios químicos importantes en el proceso de cementación de las pastas. A partir de este punto, el pH aumenta hasta alcanzar un valor de aproximadamente 6 para los cementos con quitosán y de 6.7 para el cemento base C0. La diferencia entre estos dos resultados se puede atribuir a la forma en la que fue añadido el quitosán con ácido fosfórico, lo cual disminuyó el pH general de estas pastas, acidificando el entorno.



**Figura 34.** Variaciones de pH a lo largo del tiempo.

Estos resultados (ver figura 34) presentan oscilaciones debido a que la renovación del líquido no fue continua, de forma que se parte de un pH de 7.4 cada vez que el líquido fue cambiado.

## Discusión global

La adición de quitosán en distintas cantidades afectó a las propiedades básicas de la formulación base del cemento.

De forma inmediata se pudo apreciar un aumento en la consistencia de las pastas dependiente de la cantidad de quitosán añadido, así como un aumento en sus propiedades de cohesión, lo cual permitió sumergir en fluido fisiológico simulado un poco de cada cemento sin que éste

perdiera su forma o se desintegrara. Este aumento de cohesión entre partículas se debió a que las pastas se prepararon con un líquido viscoso obtenido con distintas cantidades de quitosán, de forma que el aumento de viscosidad de las pastas incrementó la interacción entre las partículas del cemento, produciendo un entramado más denso y una estructura más compacta según la cantidad de biopolímero añadido.

Así, de forma comparativa entre las formulaciones con quitosán, el C15 fue el que presentó las propiedades mecánicas más altas, además de una morfología cristalina más densa y ordenada.

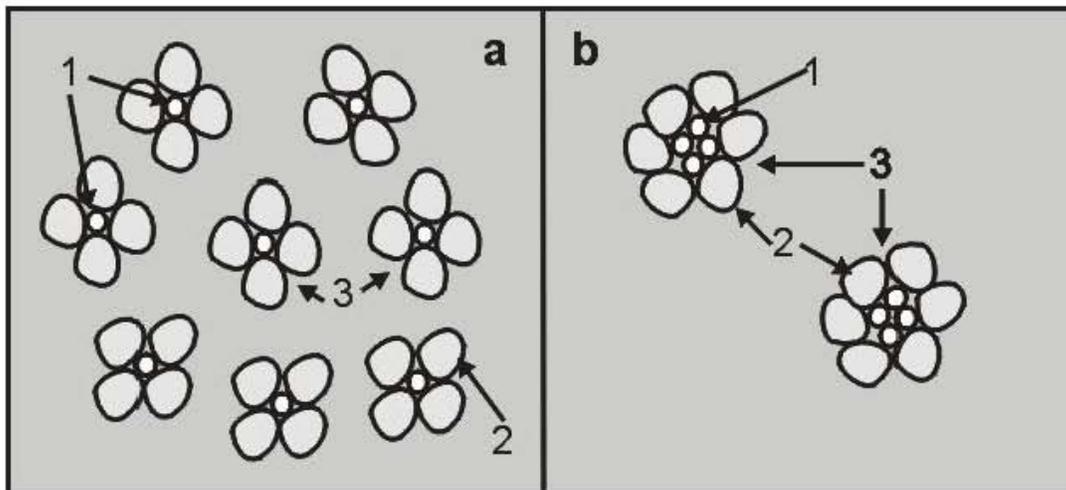
Sin embargo, el mayor efecto producido en el cemento fue el retraso en la reacción de fraguado, más específicamente en el inicio de esta reacción, ya que como se puede ver en la figura 16, el tiempo de fraguado inicial aumentó de forma proporcional al quitosán, mientras que el tiempo de fraguado total ( $F - I$ ) se mantuvo prácticamente inalterado.

Esta reacción de fraguado es el primer indicio de cambios químicos dentro de las pastas de los cementos, de forma que el retardo en esta reacción implica un retraso en la cementación, lo cual se hizo evidente a lo largo del seguimiento de la reacción por difracción de rayos X, existiendo la presencia de compuestos intermedios de reacción (DCPD y OCP) únicamente para las pastas con quitosán.

El retraso de la reacción se debió a que el quitosán actuó como una especie de "aislante" químico para las partículas de fosfato de calcio. Al momento de crear la pasta, el quitosán (cuyas moléculas son grandes por tratarse de un polisacárido), se adsorbió a la superficie de las partículas de  $\alpha$ -TCP, deteniendo la disolución de los fosfatos debido a la baja solubilidad del quitosán en soluciones acuosas. Esta reacción, sin embargo, no se vio totalmente paralizada, ya que la evolución de estas

pastas continuó hasta formar HA, de la misma forma que el cemento sin quitosán; es decir, la reacción únicamente se vio retrasada por la adición de quitosán.

Como consecuencia de este retraso, las propiedades mecánicas de los cementos se vieron comprometidas, ya que al no evolucionar completamente a HA (compuesto con mayor estabilidad mecánica), su resistencia fue menor a la del cemento C0.



**Figura 35.** Esquema de la formación de agregados a causa del quitosán: 1 = partículas de  $\alpha$ -TCP, 2 = partículas de quitosán, 3 = espacios o poros que permiten la hidratación lenta del  $\alpha$ -TCP. En a. se representa el cemento con mayor cantidad de quitosán, lo cual forma mayor cantidad de puntos de nucleación, así como un arreglo más denso en comparación con un cemento con poca cantidad de quitosán representado en b.

La interacción entre partículas de quitosán y de  $\alpha$ -TCP fue únicamente en la superficie de los fosfatos, formando cúmulos o agregados que se hicieron evidentes en las micrografías de los cementos C10 y C15 (ver figura 31). De esta forma, al tener mayor cantidad de quitosán, estos cúmulos fueron más pequeños debido a que se tuvo más capacidad de cubrir una mayor área superficial que con pocas partículas de quitosán (ver figura 35). Esto afectó a la nucleación y crecimiento de cristales de HA, ya que al tener menor cantidad de agregados de mayor

tamaño (cemento C5), los puntos de nucleación fueron menores, permitiendo además la formación de cristales más grandes. Esta diferencia en el tamaño del cristal también afectó de forma directa a las propiedades mecánicas, siendo más bajas para el cemento con menor cantidad de quitosán C5.

La formación de estos cúmulos también afectó la velocidad de cementación, ya que al tener agregados pequeños, se obtuvo mayor área superficial y menor volumen de partículas de  $\alpha$ -TCP para disolver, permitiendo una transformación más rápida en HA, la cual se puede observar por la presencia de menos productos intermedios para el cemento con la mayor cantidad de quitosán.

El análisis de la evolución de la reacción mostró además cambios en la cantidad de los compuestos intermedios presentes aún a los 28 días para los cementos con quitosán (ver figura 28), tiempo en el que se esperaría que la reacción de cementación hubiese terminado. Esto sugiere que si se continuara este estudio por un lapso de tiempo mayor, se observaría la evolución completa de estos compuestos en HA, pudiendo variar todavía las propiedades mecánicas de los cementos así como la morfología cristalina.

Por último, el seguimiento del pH del fluido donde los cementos fueron sumergidos permitió por un lado comparar los efectos de las pastas con el medio de implantación, y por otro reafirmar el seguimiento de la reacción al observar cambios mayores en los primeros días desde la preparación de las pastas, tiempos en los que ocurrieron los principales cambios químicos, de resistencia y de morfología cristalina. Además, se pudo observar que el comportamiento de los cementos con quitosán fue el mismo que el del cemento control C0, lo cual indica que no existe ningún efecto en la reacción química al formarse HA, sólo su retraso, como ya se explicó anteriormente.

## CONCLUSIONES

La adición de quitosán a la formulación base del cemento se logró de forma efectiva mediante su disolución en ácido fosfórico [1M], obteniendo distintas formulaciones con una variación en la cantidad de este biopolímero. Este procedimiento permitió aumentar la consistencia de la pasta, haciendo más fácil su manejo y moldeo en comparación con el cemento sin quitosán.

El añadir pequeñas cantidades de quitosán a la formulación base del biocemento tuvo dos efectos: por un lado el aumentar la cohesión entre partículas y por otro el retraso de la evolución de fraguado y cementación de las pastas.

El aumento de cohesión se pudo observar en la capacidad de los cementos de ser sumergidos en fluido fisiológico sin presentar desintegración, así como un mayor ordenamiento y compactación en la morfología cristalina resultante.

El retraso de la reacción química se debió a la adsorción de quitosán en la superficie de las partículas de  $\alpha$ -TCP, aislando los fosfatos de la fase líquida para su hidratación, lo cual se pudo observar por la presencia de DCPD y OCP, los cuales son productos intermedios de reacción en la formación de HA. Esta interacción quitosán -  $\alpha$ -TCP formó

cúmulos que dependieron de la cantidad de biopolímero agregado, siendo pequeños y en mayor cantidad para el cemento con más quitosán.

La presencia de estos cúmulos afectó el proceso de nucleación de cristales de HA, ya que al tener mayor cantidad de partículas de fosfato unidas, se obtuvo menor cantidad de puntos de nucleación, permitiendo además un crecimiento de cristales más grandes, el cual también fue posible por las velocidades bajas de reacción.

Tanto la velocidad de reacción como el tamaño y ordenamiento de los cristales obtenidos tuvieron un efecto en las propiedades mecánicas de los cementos, siendo el cemento con menor cantidad de quitosán el que presentó la resistencia más baja, así como la formación de cristales más grandes y sin un ordenamiento en una dirección preferencial, además de mayor cantidad de DCPD y OCP.

El seguimiento del pH del medio de implantación de los cementos mostró variaciones que corresponden a los tiempos en los que ocurren los principales cambios en la reacción de cementación. El comportamiento seguido por todos los cementos fue el mismo, lo cual indica que la presencia de quitosán no afecta la reacción química seguida para la formación final de HA.

## REFERENCIAS

- [1] Sastre R., Aza S., San Román J., "Biomateriales". Programa Iberoamericano CYTED, Faenza Editrice Iberica, Italia, 2004
- [2] Guzmán C., "Síntesis y caracterización de la hidroxiapatita por procedimientos de vía húmeda", Tesis de maestría, UNAM, 2004
- [3] van Mullem P.J., "Histology of bone: a synopsis", en de Groot K. editor, Bioceramics of Calcium Phosphate, CRC Press, USA, 2000, pp. 53-78
- [4] Sanzana E., "Estudio comparativo de la utilidad de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutivos óseos en defectos cavitarios experimentales", Tesis doctoral, Universitat de Barcelona, España 2004
- [5] Ravaglioli A., Krajewski A., "Bioceramics. Materials, Properties and Applications", Chapman & Hall, Gran Bretaña, 1992
- [6] Junqueira L.C., "Histología Básica", 4ª edición, Salvat Editores, Barcelona España, 1996

- [7] Takaoka K., Yoshikawa H., "Bone-inducing factors in osteoinductive implants", en Wise D. L. editor, *Human Biomaterials Applications*, Human Press Inc., USA, 1996, pp. 91-98
- [8] Medina N., "Estudio y caracterización de biocementos durante la hidratación", Tesis de maestría, UNAM, 2005
- [9] Brown P.W., Constantz B., "Hydroxyapatite and Related Materials", CRC Press, USA, 1994
- [10] Kenny S.M., Buggy M., "Bone cements and fillers: a review", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **14** (2003) 923-938
- [11] Hench L., "An Introduction to Bioceramics", CRC Press, USA, 1990
- [12] Montufar B., "Caracterización fisicoquímica y mecánica de tres cementos óseos en base alfa fosfato tricálcico reforzados con óxido de zirconio", Tesis de maestría, UNAM, 2005
- [13] Fernández E., Gil F.J., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A., "Calcium phosphate bone cement for clinical applications part I: solution chemistry", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **10** (1999) 169-176
- [14] Leroux L., Hatim Z., Frèche M., Lacout J.L., "Effects of various adjuvants (lactic acid, glycerol, and chitosan) on the injectability of a calcium phosphate cement" *Bone* **25** (1999) 31S-34S
- [15] ASTM C266-99 "Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic-cement Paste by Gillmore Needles", vol. 04.01, USA, pp. 169-176
- [16] Fernández E., Vlad M.D., Gel M.M., López J., Torres R., Cauch J.V., Bohner M., "Modulation of porosity in apatitic cements by the

- use of  $\alpha$ -tricalcium phosphate-calcium sulphate dihydrate mixtures" *Biomaterials* **26** (2005) 3395–3404
- [17] Khairoun I., Boltong M.G., Driessens F.C. M., Planell J.A., "Limited compliance of some apatitic calcium phosphate bone cements with clinical requirements" *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **9** (1998) 667-671
- [18] Bohner M., Baroud G., "Injectability of calcium phosphate pastes", *Biomaterials* **26** (2005) 1553–1563
- [19] Gbureck U., Barralet J.E., Spatz K., Grover L.M., Thull R., "Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part I: hypodermic injection and strength improvement of apatite cement", *Biomaterials* **25** (2004) 2187–2195
- [20] Bigi A., Cantelli I., Panzavolta S., Rubini K., " $\alpha$ -Tricalcium phosphate-gelatin composite cements" *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics* **2** (2004) 81-87
- [21] Takagi S., Chow L.C., Hirayama S., Eichmiller F.C., "Properties of elastomeric calcium phosphate cement–chitosan composites" *Dental Materials* **19** (2003) 797–804
- [22] Hockin X., Simon C.G., "Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility" *Biomaterials* **26** (2005) 1337–1348
- [23] Takagi S., Chow L.C., Hirayama S., Sugawara A., "Premixed calcium–phosphate cement pastes" *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* **67B** (2003) 689–696
- [24] Hockin X., Eichmiller F.C., Giuseppetti A.A., "Reinforcement of a self-setting calcium phosphate cement with different fibers" *J Biomed Mater Res* **52** (2000) 107–114

- [25] Karageorgiou V., Kaplan D., "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis" *Biomaterials* **26** (2005) 5474–5491
- [26] Hockin X., Quinn J.B., "Calcium phosphate cement containing resorbable fibers for short-term reinforcement and macroporosity" *Biomaterials* **23** (2002) 193–202
- [27] del Real R.P., Wolke J.G.C., Vallet-Regí M., Jansen J.A., "A new method to produce macropores in calcium phosphate cements" *Biomaterials* **23** (2002) 3673–3680
- [28] Takagi S., Chow I.C., "Formation of macropores in calcium phosphate cement implants" *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **12** (2001) 135-139
- [29] Di Martino A., Sittinger M., Risbud M. V., "Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering", *Biomaterials* **26** (2005) 5983–5990
- [30] Khor E., Lee Y.L., "Implantable applications of chitin and chitosan", *Biomaterials* **24** (2003) 2339–2349
- [31] Dormard A., "Chitosan: structure-properties relationship and biomedical applications" en Dimitriu S. editor, *Polymeric biomaterials*, 2a ed. NY-USA 2002 pp. 187-212
- [32] Salomone, J., "Polymeric Materials Encyclopedia", Vol. 3, CRC Press, USA, 1999, pp. 1865 - 1866
- [33] Koide S., "Chitin-chitosan: properties, benefits and risks", *Nutrition Research* **18** (1998) 1091-1101
- [34] Shikinami Y., Matsusue Y., Nakamura T., "The complete process of bioresorption and bone replacement using devices made of forged composites of raw hydroxyapatite particles/ poly L-lactide (F-u-HA/PLLA)" *Biomaterials* **26** (2005) 5542–5551

- [35] Yokoyama A., Yamamoto S., Kawasaki T., Kohgb T., Nakasu M., "Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials", *Biomaterials* **23** (2002) 1091-1101
- [36] Wang X, Ma J., Feng Q., Cui F., "Skeletal repair in rabbits with calcium phosphate cements incorporated phosphorylated chitin", *Biomaterials* **23** (2002) 4591-4600
- [37] Wang X., Ma J., Wang Y, He B., "Structural characterization of phosphorylated chitosan and their applications as efective additives of calcium phosphate cements" *Biomaterials* **22** (2001) 2247-2255
- [38] Fernández E., Bolotong M.G., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Bermúdez O., Planell J.A., "Development of a method to measure the period of swelling of calcium phosphate cements", *Journal of Materials Science Letters* **15** (1996) 1004-1005
- [39] Callister W., "Materials Science and Engineering an Introduction", Wiley and sons, USA, 2003