

Bioactividad y biocompatibilidad de compósitos de zirconia estabilizada con Y/ hidroxiapatita-Cu, Fosfato Tricálcico-Ag o Fosfato Tricálcico-Ga.

M. E. Álvarez-Monsiváis^a, B.R. Cruz-Ortiz^a, I. Olivas-Armendáriz^b, A. Sáenz-Galindo^a, S. G. Solís-Rosales^c, E. M. Múzquiz-Ramos^{a*}

^a Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo Coahuila, México.

^b Instituto de Ingeniería y Tecnología, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez Chihuahua, México.

^c Centro de Investigación en Química Aplicada, Saltillo Coahuila, México.

Bioactivity and biocompatibility of zirconia Y stabilized /hydroxyapatite-Cu, Tricalcic Phosphate-Ag or Tricalcic Phosphate-Ga composites.

Bioactivitat i biocompatibilitat de compòsits de zirconia estabilitzada amb Y/ hidroxiapatita-Cu, Fosfat Tricàlcic-Ag o Fosfat Tricàlcic-Ga.

RECEIVED: 22 FEBRUARY 2021; REVISED: 22 JUNE 2021; ACCEPTED: 28 JUNE 2021

ABSTRACT

The biological compatibility of bone and dental implants is limited, since it is placed until a long time after it has been implanted, due to its low resistance of infections attributed to a quick degradation of the implant which is present in the physiological fluids. Therefore, in this investigation, hydroxyapatite-zirconia (HA-ZrO₂) composite materials were developed, where zirconia was stabilized with yttrium and hydroxyapatite was doped with silver, copper and gallium, in order to give biological properties to the composite that the zirconia does not present. Each component of the composite material has different characteristics; such as hydroxyapatite (HA) that provides it a bioactive behavior, On the other hand ZrO₂ stabilized with yttrium gives it excellent resistance; otherwise, Ag, Ga and Cu provide antimicrobial properties. To obtain these systems, the materials were synthesized by the Pechini method and chemical precipitation. Afterward the compounds were obtained and tested by bioactivity tests, hemolysis, cell viability studies by the MTT method and osteoblast adhesion by staining, hence there were obtained bioactive, non-hemolytic, non-toxic materials with cell adhesion to the composite. and as a result of that, these awesome materials can be useful for dental implants.

Keywords

Bioactivity, biocompatibility, hydroxyapatite, zirconia.

RESUMEN

La compatibilidad biológica de implantes óseos y dentales está limitada, desde que se coloca hasta después de un largo tiempo de estar implantado, debido a su baja resistencia a infecciones atribuidas a una degradación rápida del implante al estar en presencia de fluidos fisiológicos. Es por esto, que en la presente investigación se desarrollaron materiales compuestos de hidroxiapatita-zirconia (HA-ZrO₂), en donde la zirconia se estabilizó con ytrio y la hidroxiapatita se dopó con plata, cobre y galio, para otorgarle al compósito propiedades biológicas que no presenta la zirconia como tal. Cada componente del material compuesto le confiere diferentes características; como la hidroxiapatita (HA) que le proporciona un comportamiento bioactivo, la ZrO₂ estabilizada con ytrio le confiere excelente resistencia; mientras que la Ag, Ga y Cu le proveen propiedades antimicrobianas. Para la obtención de estos sistemas, se sintetizaron los materiales por el método de Pechini y de precipitación química, posteriormente se obtuvieron los compósitos y se probaron en estudios de bioactividad, hemólisis, viabilidad celular por el método de MTT y adhesión de osteoblastos por tinción. Se obtuvieron materiales bioactivos, no hemolíticos, no tóxicos y con adhesión de células al compósito. Estos novedosos materiales pueden ser útiles para implantes óseos y dentales.

Palabras clave

Bioactividad, biocompatibilidad, hidroxiapatita, zirconia.

*Corresponding author: emuzquiz@uadec.edu.mx

RESUM

La compatibilitat biològica d'implants ossis i dentals està limitada, des que es col·loca fins després d'un llarg temps d'estar implantat, a causa de la baixa resistència a infeccions atribuïdes a una degradació ràpida de l'implant en estar en presència de fluids fisiològics. És per això, que en aquesta investigació es van desenvolupar materials compostos d'hidroxiapatita-zircònia (HA-ZrO₂), on la zircònia es va estabilitzar amb itrio i la hidroxiapatita es va dopar amb plata, coure i galli, per atorgar-li al compost propietats biològiques que no presenta la zircònia com a tal. Cada component del material compost li confereix diferents característiques; com la hidroxiapatita (HA) que li proporciona un comportament bioactiu, la ZrO₂ estabilitzada amb itrio li confereix excel·lent resistència; mentre que l'Ag, Ga i Cu li proveeixen propietats antimicrobianes. Per obtenir aquests sistemes, es van sintetitzar els materials pel mètode de Pechini i de precipitació química, posteriorment es van obtenir els composts i es van provar en estudis de bioactivitat, hemòlisi, viabilitat cel·lular pel mètode de MTT i adhesió d'osteoblasts per tinció. S'obtingueren materials bioactius, no hemolítics, no tòxics i amb adhesió de cèl·lules al compost. Aquests nous materials poden ser útils per a implants ossis i dentals.

Paraules clau: Bioactivitat, biocompatibilitat, hidroxiapatita, zircònia

INTRODUCCIÓN

Los materiales que tienen la capacidad de estar en contacto con tejidos vivos sin dañarlos, completando y mejorando su funcionamiento son conocidos como biomateriales [1]. Los biomateriales compuestos con calcio como base son muy populares para implantes óseos y dentales debido a que el hueso está constituido por fosfatos de calcio [2]. Las nuevas tecnologías han desarrollado materiales con propiedades físicas, químicas y mecánicas adecuadas para este tipo de implantes.

Los biocerámicos se caracterizan por sus numerosas propiedades adecuadas para implantes, tales como resistencia a la corrosión y compresión, baja toxicidad, biocompatibilidad, pero especialmente su cualidad de regeneración del tejido óseo [3]. De entre los biocerámicos, la hidroxiapatita (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂), tiene un lugar importante en los implantes óseos y dentales, ya que ha sido utilizada como recubrimiento de metales, relleno de hueso, injerto de hueso poroso y además se han utilizado partículas de hidroxiapatita para obtención de compósitos [4] [5].

Las propiedades mecánicas en los implantes óseos aseguran que éste soporte los esfuerzos a los que se somete al realizar su función en actividades cotidianas. Debido a su resistencia mecánicas, es común la utilización de zirconia estabilizada con ytrio en implantes, ésta estabilización es necesaria para mantener la estructura cristalina de la zirconia (ZrO₂) aunque esté en un medio acuoso, sin embargo, es sabido que

el material es inerte e incapaz de unirse químicamente al cuerpo humano [6]. Además, es no reabsorbible por lo que dificulta su degradación, aunque se ha mencionado que esta propiedad resulta favorable en los cementos selladores dentales [7]. En otras investigaciones se ha comprobado que la zirconia no reabsorbible, tiene propiedades osteoconductoras [8] al ser modificada con otro elemento [9] lo cual indica que no afecta la regeneración ósea.

Existen diferentes investigaciones realizadas en torno al dopaje de la hidroxiapatita (HA) con elementos que refuerzan y mejoran sus propiedades ya sea químicas o físicas. Las más demandadas son las propiedades antimicrobianas para obtener un material con aplicación médica que reduzca o elimine la necesidad de usar antibióticos [10]. Se seleccionaron el galio [11] [12], la plata [13] [14] y el cobre por sus características antimicrobianas y sus comportamientos biológicos probados [15] [16].

Existe información de la estabilización de la zirconia con ytrio [17] [18] y del dopaje de la hidroxiapatita con diferentes elementos, pero no existen reportes de materiales compuestos de HA/ZrO₂ como el que se desarrolló en este estudio, con el propósito de generar conocimiento científico tanto en la obtención de éstos materiales como de su valoración biológica, considerando que en un futuro pudieran ser útiles para aplicaciones biomédicas tales como ortopedia u odontológica [19] [20].

MATERIALES Y METODOS

Síntesis y fabricación de los compósitos

Por una parte, se obtuvo la zirconia estabilizada con 4% de ytrio (ZrO₂), y por otra parte la hidroxiapatita sustituida con 1 mol de Ag, Cu, o Ga (HAAg, HACu, HAGa respectivamente), para posteriormente, mediante molida mecánica, obtener materiales compuestos de HAAg/ZrO₂, HACu/ZrO₂ y HAGa/ZrO₂.

La zirconia estabilizada con 4% mol de ytrio se obtuvo con el método de Pechini utilizando los reactivos Hidroxiacetato de zirconio C₆H₉O₆Zr·xH₂O (99.9% de Sigma Aldrich), Hidroxiacetato de ytrio C₆H₉O₆Y·xH₂O (99.9% de Sigma Aldrich), Ácido cítrico C₂H₄O₃ (Fisher Scientific) y Etilenglicol C₂H₄O₂ (99.5% de Jalmek Científica). Los precursores fueron ácido cítrico y etilenglicol que permiten la reacción de esterificación [21].

Se disuelven los reactivos uno a uno a 70 °C, primero el ácido cítrico en el etilenglicol, en seguida el hidroxiacetato de zirconia y finalmente el hidroxiacetato de ytrio para tener un gel que posteriormente es secado por 12 horas a 120 °C. Finalmente se realiza un tratamiento térmico a 1000 °C en una mufla Thermo Scientific modelo BF518 para obtener la zirconia estabilizada con ytrio en forma de polvo blanco.

Para obtener la hidroxiapatita dopada con un mol de galio (HAGa) y la dopada con un mol de plata (HAAg) respectivamente, también se siguió el método Pechini, utilizando los reactivos Nitrato de plata AgNO₃ (99.8% EMDAR MERCK), Nitrato de galio Ga(NO₃)₃ (99%

de Sigma Aldrich), Nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (99% de Sigma Aldrich), Fosfato de amonio $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (98% de Sigma Aldrich) Ácido cítrico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (99.5% de Jalmek Científica) y Etilenglicol $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$ (Fisher Scientific). Buscando mantener una relación Ca/P de 1.67, se disolvieron los reactivos a 70 °C por dos horas hasta obtener el gel, enseguida se secaron a 120 °C por 12 h, obteniéndose una resina espumosa. Después se trataron térmicamente a 1100 °C por dos horas y el producto fue un polvo blanco.

La HACu se sintetizó por precipitación química y se utilizaron los reactivos Hidróxido de amonio (NH_4OH al 30% de Jalmek), Nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (99% de Sigma Aldrich), Fosfato de amonio $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (98% de Sigma Aldrich) y Sulfato de cobre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (98% Fermont). Se disolvieron en agua destilada por 20 min con una relación de reactivo-agua diferente para cada uno, el $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y el $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (1 g/50 ml), y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/50 ml). La solución del $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ se adicionó a la del $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ por 5 min y enseguida se le agrego el NH_4OH gota a gota durante 30 min a temperatura ambiente y después se elevó la temperatura a 70 °C manteniéndose por tres horas. La solución se filtró y secó a 90 °C por 12 h y se realizó un tratamiento térmico a 500 °C por dos horas.

Los compositos se obtuvieron de la mezcla de HA dopada y ZrO_2 por el método de activación mecánica con una relación HA- ZrO_2 de 70:30% en masa en un molino planetario con un contenedor de óxido de zirconia con bolas de molienda del mismo material.

Las fases obtenidas se determinaron mediante un análisis por DRX para lo cual se utilizó un equipo PANalytical Empyrean con radiación $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1.5460 \text{ \AA}$) en un rango de 10° a 80° a 40 Kv. Para la determinación de los grupos funcionales, se utilizó un espectrofotómetro FT-IR Pekín Elmer Nicolet Nexus 47, equipado con ATR (Attenuated Total Reflection) con un ángulo de incidencia de 45° y cristal de diamante, a una resolución de 4 cm^{-1} y frecuencia desde 500 hasta 4000 cm^{-1} .

Se evaluaron propiedades biológicas con las pruebas de bioactividad en SBF, hemocompatibilidad con eritrocitos, viabilidad celular, morfología y adhesión de osteoblastos mediante fluoróforos.

Prueba de bioactividad en SBF

Para realizar la prueba de bioactividad, se elaboraron tabletas por compresión en una prensa uniaxial Strongway 46269, después se sometieron a un tratamiento de densificado de 1000 °C por dos horas para el compósito HA Ag/ZrO_2 , 500 °C por dos horas para el compósito de HACu/ ZrO_2 y 1200 °C por dos horas en el compósito HAGa/ ZrO_2 . Se utilizaron diferentes temperaturas para los tratamientos térmicos conforme a las características de los iones que doparon las hidroxiapatitas y de acuerdo a lo reportado en otras investigaciones, en las cuales se llevaron a cabo tratamientos de densificación para materiales compuestos con Ga [22], Ag [23] y Cu [24].

Para evaluar la bioactividad de los materiales, se procedió a la inmersión de estos en una solución SBF (fluido fisiológico simulado por sus siglas en inglés).

Esta solución se preparó al adicionar a 1 litro de agua desionizada uno a uno los siguientes reactivos [25]: cloruro de sodio (NaCl), bicarbonato de sodio (NaHCO_3), cloruro de potasio (KCl), fosfato de potasio trihidratado ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), ácido clorhídrico (HCl), cloruro de calcio (CaCl_2), sulfato de sodio (Na_2SO_4), trisaminometano ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) y ajustando el pH a 7.4 a una temperatura de 36 °C. Los compósitos se colocaron en frascos sumergidos en la solución que se cambió cada 7 días por solución fresca, los compósitos estuvieron sumergidos durante 7,14 y 21 días. Al terminar el tiempo de inmersión las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de barrido de alta resolución (MEB) Jeol JSM-7041F y se evaluó la bioactividad en la superficie del material.

Prueba de hemocompatibilidad con eritrocitos

Las pruebas de hemólisis se efectuaron en base a la norma ASTM F-756-00[26]. Para esto se preparó una solución de Alsever, la cual consiste en disolver en 1 litro de agua desionizada citrato trisódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), cloruro de sodio (NaCl) y D-glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$).

Se recolectó una muestra de sangre de 4 ml de un donador sano de sexo masculino en un tubo de ensayo con EDTA la muestra se centrifugó a 3000 rpm durante 4 min, lavándose con solución de Alsever tres veces para obtener una solución concentrada de eritrocitos. Posteriormente se tomaron 100 μl de esta solución y 9900 μl de solución Alsever y fueron agitados suavemente para obtener una suspensión.

En tubos de ensayo se colocaron 2.5, 5 y 10 mg/ml de cada compósito con 1850 μl de solución Alsever y 150 μl de la suspensión antes descrita. Se preparó un control negativo con eritrocitos-solución Alsever y un control positivo con eritrocitos-agua desionizada. Las muestras fueron incubadas a 37 °C por una hora y posteriormente centrifugadas, el sobrenadante de los tubos se analizó en un espectrofotómetro UV-VIS PerkinElmer utilizando una longitud de onda de 412 nm. Se obtuvo el % de hemólisis al introducir las lecturas de absorbancia en la ecuación [1]:[1]

Prueba de viabilidad celular

Los análisis de viabilidad y proliferación celular se llevaron a cabo con el método 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), empleando la línea celular 3T3 de osteoblastos de ratón (3T3, ATCC®) [27].

Las muestras de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, fueron cultivadas con 10,000 células en una microplaca de 32 pozos incubadas en D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina) por 24 h a 37 °C y 5% de CO_2 .

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, a las muestras se les retiró el medio de cultivo y se reemplazó por medio nuevo conteniendo una solución de MTT (0.5 mg/ml), se incubaron por 4 h a 37 °C con 5% de CO_2 . Los cristales de formazán obtenidos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO). La absorbancia se midió en un lector ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent

Assay) a 570 nm. Se utilizó un control positivo durante el ensayo, células sin estar expuesta al material.

Prueba de la morfología y adhesión de osteoblastos mediante fluoroforos

A las 24 h de cultivo se agregaron 200 μ l de una solución de DAPI (10 μ g en 100 ml de PBS 1X) y 200 μ l de una solución de Calcein AM (50 μ g en 10 mL de PBS 1X), se incubaron en oscuridad por 45 min y se observaron en un microscopio (Ze Axio Vert A1) en configuración de reflectancia para obtener imágenes utilizando el software Zen blue.

Análisis estadístico

Los valores se expresaron como medias \pm desviación estándar (SD). Se utilizó la prueba t de student de dos colas para discernir la diferencia estadística entre los grupos. Un valor de probabilidad menor de 0.05 ($p < 0.05$) se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los compósitos

Mediante DRX se obtuvieron los difractogramas de los compósitos HAg/ZrO₂, HAaG/ZrO₂, HACu/ZrO₂ conformados por HA dopada con 1 mol de Ga-Ag-Cu y ZrO₂ estabilizada con 4 mol de ytrio. Los compósitos se formaron con un 70% en masa de HA y 30% ZrO₂ estabilizada.

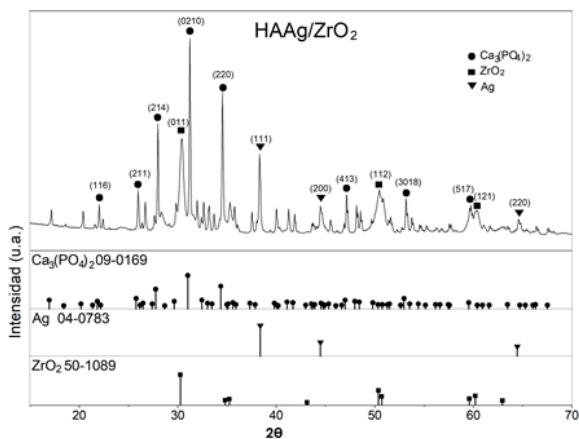


Figura 1. Patrón DRX del compuesto HAAg/ZrO₂ que se obtuvo del conformado de los polvos de HA dopada con Ag y ZrO₂ estabilizada con ytrio mediante mezclado mecánico y un tratamiento posterior de densificación a 1000 °C.

En la Figura 1, se presenta el patrón de DRX del compuesto HAAg/ZrO₂, en el cual se observa una fase de Ca₃(PO₄)₂, la cual corresponde al fosfato tricálcico β (β -TCP) según la carta cristalográfica PDF 09-0169, cuyos ángulos 2 θ : 22.2°, 26.1°, 27.7°, 31.02°, 34.3°, 46.6°, 53.5° y 59.5°, corresponden a los planos cristalográficos (116), (211), (214), (0210), (220), (413), (3018) y (517) respectivamente. También se presenta la fase ZrO₂ que se identificó con la carta cristalográfica PDF 50-1089, en donde se observan los ángulos 2 θ : 30.7°, 50.37° y 60.2°

que corresponden a los planos cristalográficos (011), (112) y (121) respectivamente. Además, está presente la plata elemental (Ag⁰) según la carta PDF 04-0783, los ángulos 2 θ 38.1°, 44.2° y 64.4° pertenecen a los planos cristalográficos (111), (200) y (220) respectivamente. Esto indica que la Ag no se incorporó a la estructura de la HA, por lo que no se puede hablar de un dopaje de HA con Ag, sino de un material compuesto de Ag, β -TCP y ZrO₂.

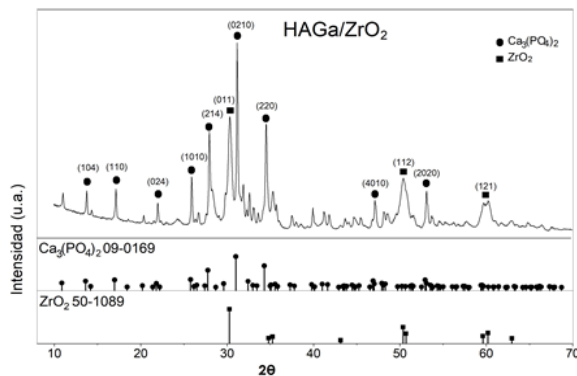


Figura 2. Patrón DRX del compuesto de HAg/ZrO₂ que se obtuvo del conformado de los polvos de HA dopada con Ga y ZrO₂ estabilizada con ytrio mediante mezclado mecánico y un tratamiento posterior de densificado a 1200 °C.

En la Figura 2 se presenta el patrón DRX del compuesto HAg/ZrO₂, en la que se puede observar la presencia de β -TCP de acuerdo con la carta cristalográfica PDF 09-0169, cuyos ángulos 2 θ más significativos a 13.6°, 17°, 21.8°, 25.8°, 27.7°, 31.02°, 34.3°, 46.9° y 52.9°, corresponden a los planos cristalográficos (104), (110), (024), (1010), (214), (0210), (220), (4010) y (2020) respectivamente. En el DRX se observa, además, una segunda fase que corresponde a la ZrO₂ según la carta cristalográfica PDF 50-1089. Los ángulos 2 θ : 30.2°, 50.37° y 60.2° corresponden a los planos cristalográficos (011), (112) y (121) respectivamente. El difractograma no revela la presencia de otras fases, lo cual indica que el Ga probablemente se incorporó a la estructura del compuesto.

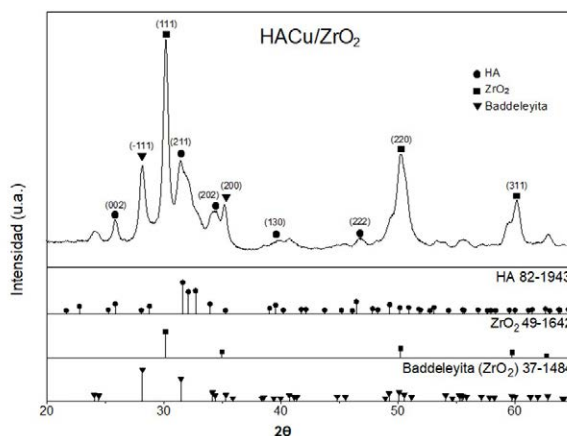


Figura 3 Patrón DRX del compuesto de HACu/ZrO₂ que se obtuvo del conformado de polvos HA dopada con Cu y ZrO₂ estabilizada con ytrio mediante mezclado mecánico y un tratamiento posterior de densificado a 500 °C.

En la Figura 3 se presenta patrón DRX del compuesto HACu/ZrO₂ y en el que se observan tres fases: La primera fase corresponde a la HA según la carta cristalográfica PDF 82-1843, los ángulos a 2θ 25.8°, 31.6°, 34°, 39.6° y 46.5°, corresponden a los planos cristalográficos (002), (211), (202), (130) y (222) respectivamente. La segunda fase es ZrO₂ cúbica según la carta PDF 49-1642, los ángulos 2θ: 30.1°, 50.2° y 59.7°, corresponden a planos cristalográficos (111), (220) y (311) respectivamente. La tercera fase es Baddeleyita ZrO₂ monoclinica según la carta PDF 37-1484, los ángulos 2θ: 28.1° y 34.1°, corresponde a planos cristalográficos (-111) y (200). Las dos fases de zirconia resultan del cambio de la forma cristalográfica tetragonal a cúbica y monoclinica[28], debido a la temperatura del tratamiento de densificado del compuesto. En el patrón de DRX no se encontró fase

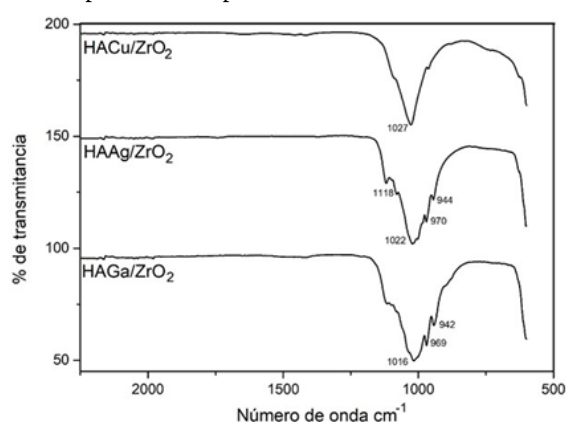


Figura 4. Espectros FT-IR de los compósitos en polvo que se obtuvieron por mezclado mecánico de HA dopada con Ag, Ga, Cu y ZrO₂ estabilizada con ytrio.

En la Figura 4 se presentan los espectros FT-IR de los materiales obtenidos, en donde se observan las bandas a 942 cm⁻¹, 944 cm⁻¹, 969 cm⁻¹, 970 cm⁻¹, 1016 cm⁻¹, 1022 cm⁻¹, 1027 cm⁻¹ y 1118 cm⁻¹ que son las vibraciones correspondientes al grupo funcional fosfato (PO₄³⁻) [29].

Bioactividad de los compósitos

En las Figuras 5, 6 y 7 se muestran imágenes que se obtuvieron por microscopía electrónica de barrido, utilizando un equipo Jeol JSM-7041F, después de 21 días de inmersión en SBF, en las cuales se observa la formación de aglomerados de pequeños cristales aciculares que forman esferas de consistencia esponjosa sobre la superficie del material, también se realizó un análisis por espectroscopia de energía dispersiva (EDS) a la superficie de los compósitos y en cada imagen se muestra la caracterización de los elementos presentes en la capa depositada. Los elementos predominantes fueron fósforo, calcio y oxígeno que corresponden a la formación de apatita similar a la ósea, demostrando que los compósitos son bioactivos.

En la Figura 5 se presenta la imagen MEB de la superficie del compuesto HAGA/ZrO₂, observándose la formación de esferas esponjosas de apatita a 5,000 aumentos y en el EDS la presencia de galio, la cual co-

rresponde al compuesto. La presencia de estas esferas indica que el material es bioactivo [30].

La Figura 6 corresponde a la imagen obtenida con 2,000 aumentos de la superficie del compuesto HAAg/ZrO₂, en la cual se aprecia el crecimiento de apatita en forma de aglomerados esféricos. El EDS indica la presencia de P, C y Ca, elementos que corresponden a la HA.

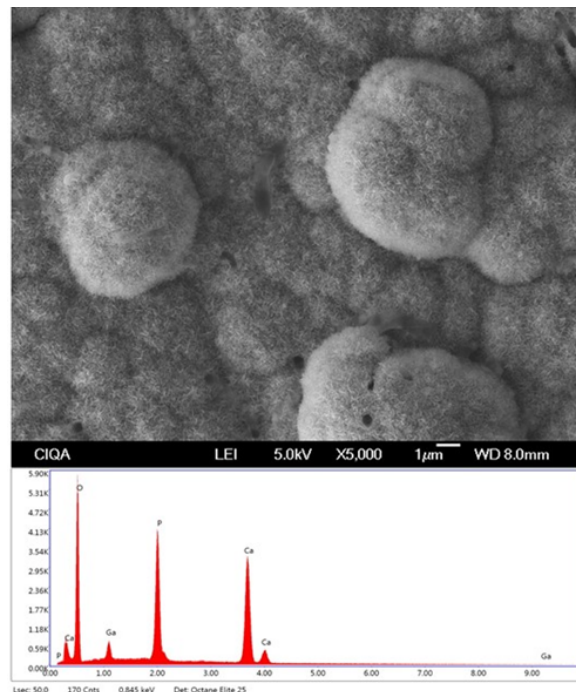


Figura 5. Imagen MEB y su correspondiente espectro EDS de la superficie del compuesto HAGA/ZrO₂ después de 21 días de inmersión en SBF.

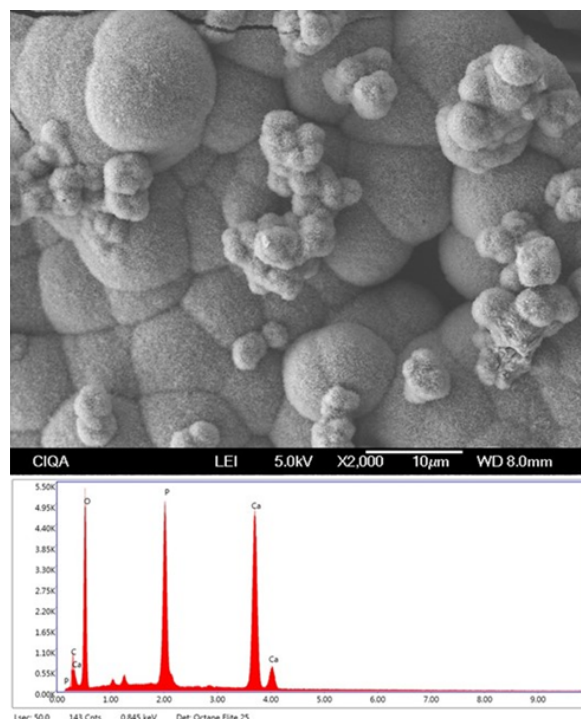


Figura 6. Imagen MEB y su correspondiente espectro EDS de la superficie del compuesto HAAg/ZrO₂ después de 21 días de inmersión en SBF.

En la Figura 7 se muestran la imagen MEB a 2,000X y el correspondiente EDS de la muestra de HACu/ZrO₂, después de 21 días de inmersión en SBF. Claramente se observa la presencia del Ca, P y O correspondientes a la HA, además de Cl, Na y Mg en menor proporción, los cuales estaban presentes en la solución de inmersión. Se demostró la bioactividad del compuesto con la presencia de crecimiento de esferas de apatita. De las Figuras 5, 6 y 7 se puede concluir, que los materiales obtenidos son bioactivos.

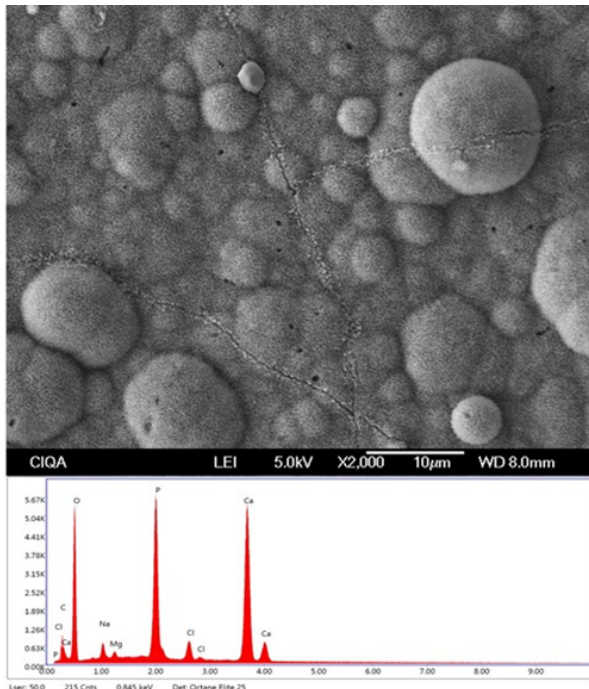


Figura 7. Imagen MEB y su correspondiente espectro EDS de la superficie del compuesto HACu/ZrO₂ después de 21 días de inmersión en SBF.

Hemólisis de los compósitos

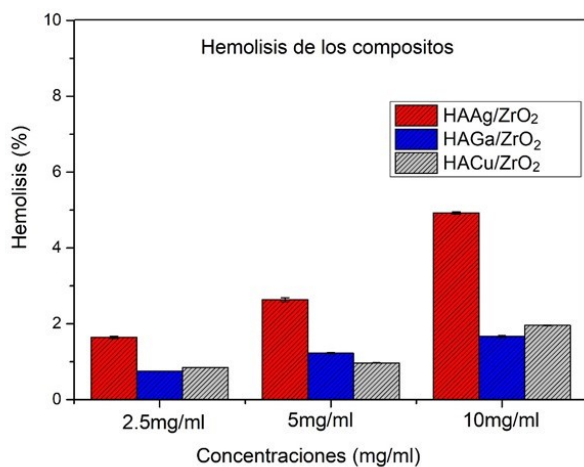


Figura 8. Efecto hemolítico según la norma ASTM F756-00 a las concentraciones 2.5, 5 y 10 mg/ml de los materiales sintetizados HAAG/ZrO₂, HAGa/ZrO₂ y HACu/ZrO₂.

En la Figura 8 se muestran los resultados de hemocompatibilidad de los compósitos con los eritrocitos a diferentes concentraciones: 2.5 mg/ml, 5 mg/ml y 10 mg/ml los cuales presentan valores de porcentaje de hemólisis menores a 4.9 %. La norma ASTM F756-00 indica que con porcentajes menores al 5% de hemólisis los materiales se consideran como no hemolíticos. De los materiales analizados, solo el compuesto HAAG/ZrO₂ resultó ligeramente hemolítico a la concentración de 10 mg/ml. Los compósitos HAGa/ZrO₂ y HACu/ZrO₂ en las tres concentraciones presentaron porcentajes de hemólisis menores al 2% de lo que se concluye que, a las concentraciones estudiadas, los materiales sintetizados no constituyen un riesgo de hemólisis al estar presentes en el cuerpo humano.

Viabilidad celular de los compósitos

En la Figura 9 se muestran los resultados del ensayo MTT de los diferentes compósitos y su control. En ella podemos observar como la viabilidad celular de los materiales a las 24 h de cultivo y a una concentración de 100 µg/ml fueron 74.5, 88.01 y 33.03% para los compósitos HAGa/ZrO₂, HAAG/ZrO₂ y HACu/ZrO₂ respectivamente. Por otra parte, al mismo periodo de tiempo y a una concentración de 50 µg/ml se pueden percibir viabilidades de 78.56, 78.73 y 26.8% para los materiales compuestos HAGa/ZrO₂, HAAG/ZrO₂ y HACu/ZrO₂. Observándose, independientemente de la concentración, diferencias significativas entre el control y los 3 materiales compuestos, entre el compuesto HACu/ZrO₂ y los compósitos HAGa/ZrO₂ y HAAG/ZrO₂, no así entre los compósitos HAGa/ZrO₂ y HAAG/ZrO₂. Resultados que muestran que los compósitos HAGa/ZrO₂ y HAAG/ZrO₂, independientemente de la concentración, no presenta efectos tóxicos a nivel celular (ISO 10993-5), lo que sugiere que no hubo afectaciones del metabolismo celular después de la exposición al mismo [31] [32]. Mientras el compuesto HACu/ZrO₂ a cualquier concentración, y en concordancia a la ISO 10993-5 induce la citotoxicidad en osteoblastos de la línea celular 3T3 [33] [34].

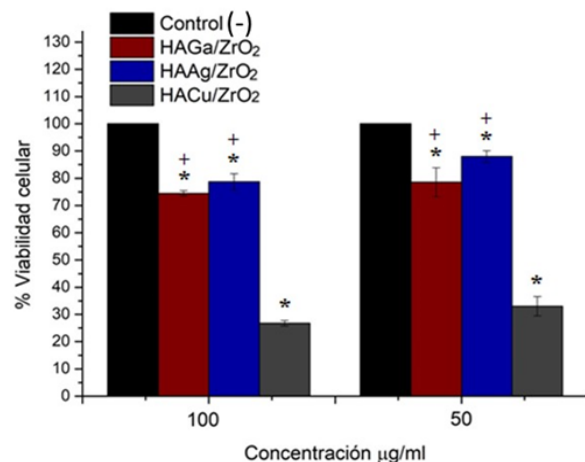


Figura 9. Porcentaje de viabilidad celular de los compósitos a 24 horas de cultivo celular. *: diferencia significativa comparado con el control y +: diferencia significativa con el compuesto HACu/ZrO₂ (P=0.05, la comparación se hace entre muestras del mismo día).

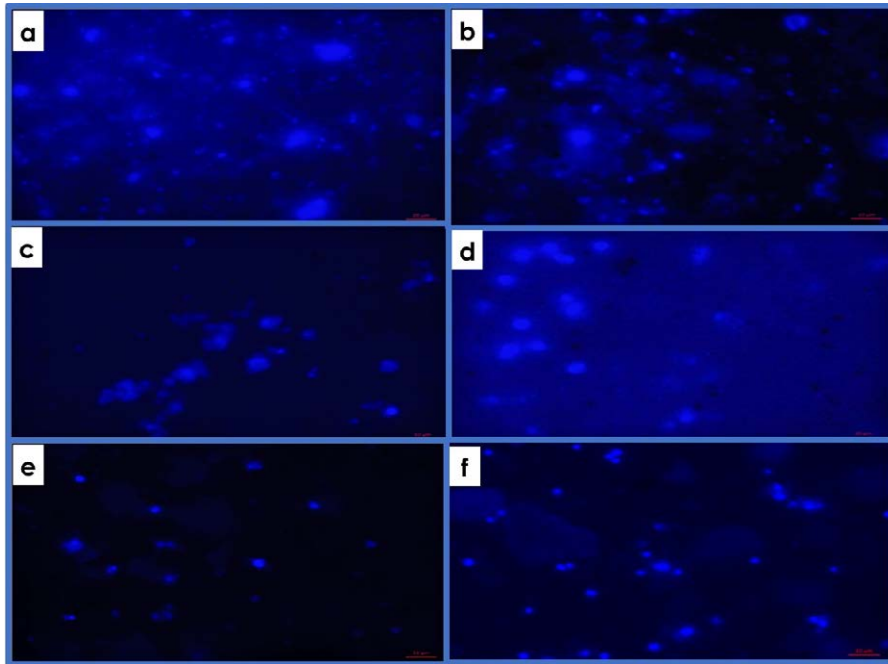


Figura 10. Adhesión de osteoblastos con la técnica de tintes fluorescentes para los compósitos a-b) HAGA/ZrO₂, c-d) HAAG/ ZrO₂ y e-f) HACu/ ZrO₂.

Morfología y adhesión de osteoblastos de los compósitos

Se realizó la tinción de osteoblastos expuestos a los compósitos utilizando dos tintes fluorescentes: DAPI, para la observación de núcleos celulares y Calcein AM para observar el citoplasma celular. En la Figura 10 se presentan las imágenes obtenidas después de la tinción y de la observación al microscopio de los diferentes compósitos y concentraciones [35]. En estas imágenes se aprecian los núcleos de los osteoblastos en color azul intenso envueltos por el citoplasma (azul menos intenso) para los diferentes compósitos. En HAGA/ZrO₂ (Figura 10a y b) y HAAG/ZrO₂ (Figura 10c y d) se aprecian los núcleos celulares adheridos al compósito con prolongaciones citoplásmicas algunas con morfología redonda y otras tratando de expandirse y tomar la forma de un osteoblasto normal. Mientras que el compósito HACu/ZrO₂ (Figura 10 e y f) se observa una disminución del número de células, las cuales muestran una morfología redonda, indicando daño celular [36].

CONCLUSIONES

Para la síntesis de HAGA/ZrO₂, HAAG/ZrO₂ por el método de Pechini, y de HACu/ZrO₂ por precipitación química, se obtuvo β-TCP por Pechini e HA por precipitación. Por inmersión en SBF se constató que los tres materiales son bioactivos, y solamente el HAAG/ZrO₂ resultó ligeramente hemolítico a concentraciones de 10 mg/ml.

Los compósitos HAGA/ZrO₂ y HAAG/ZrO₂ son materiales no tóxicos en las condiciones evaluadas y cumplen con la norma ISO 10993-5:2009. En la tinción fluorescente se obtuvo buena adhesión de estos los

compósitos porque se observaron células adheridas con núcleo-citoplasma definido. Y el compósito HACu/ZrO₂ resultó tóxico en ambas concentraciones y con un ligero daño celular en las células adheridas. Lo anterior descrito indica que los compósitos HAGA/ZrO₂ y HAAG/ZrO₂ son biomateriales que presentan propiedades biológicas como bioactividad, compatibilidad hemolítica, viabilidad celular y adhesión de osteoblastos adecuadas, figurando como muy buena opción para aplicaciones óseas y dentales que se pueden utilizar en forma de polvo si se aplica como selladores, rellenos dentales, en cementos o recubrimientos de implantes metálicos.

AGRADECIMIENTOS

El autor principal agradece al Conacyt-México, por el apoyo para realizar esta investigación por medio de la beca 330764. Y al Posgrado en Ciencia y Tecnología de Materiales de la Facultad de Ciencias Químicas de la UAdeC, por el soporte en el desarrollo de esta investigación durante los estudios de doctorado.

BIBLIOGRAFIA

1. J.Caeiro, J. Serra, P. Gonzalez, F. Muñoz, A. Gonzalez, Caracterización no destructiva de biomateriales mediante microtomografía computarizada en : P. Gonzalez, J. Gonzalez, Biomateriales: Diseño, producción y caracterización, Ed. Red Gallega de Biomateriales, España, 2015, pp.53-64.
2. W. Habraken, P. Habibovic, M. Epple, M. Bohner, Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future, *Mater Today*. 2016;19(2):69-87. doi:10.1016/j.mattod.2015.10.008

3. A.Saenz, Biomateriales: en Tecnología en Marcha, Vol.17, Costa Rica, 2013; pp 34-45.
4. R. Hernández, R. Palma, C. Piña, Hidroxiapatita y sus aplicaciones, 1998, 5(1):144-147.
5. M. Garcia, J. Reyes, La hidroxiapatita, la importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica, Revista Especializada en Ciencias. 2006;9(2):90-95.
6. N. Passia, M. Mitsias, F. Lehmann, M. Kern, Short communication Bond strength of a new generation of universal bonding systems to zirconia ceramic. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016. doi:10.1016/j.jmbbm.2016.04.045
7. M. Alain, G. Chaple, L. Herrero, Generalidades del agregado de trióxido mineral (MTA) y su aplicación en odontología: revisión de literatura, Acta odontológica Venezolana, vol. 45 No.3, 2007.
8. A. Pandey, P. Falguni, M. Debika, D. Santanu, B. Koshik, In vitro evaluation of osteoconductivity and cellular response of zirconia and alumina based ceramics, Materials Science and Engineering C, 2013; doi:10.1016/j.msec.2013.05.032
9. A. Akher, E. Md, H. Sumit, P. Ram, P. Saryoo, Mechanochemical and in vitro cytocompatibility evaluation of zirconia modified silver substituted 1393 bioactive glasses, Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, 2020; 12, doi:10.1016/j.bseecv.2020.07.002.
10. M Supová, Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceram Int.* 2015. doi:10.1016/j.ceramint.2015.03.316
11. P. Melnikov, A. Teixeira, A. Malzac, M. Coelho, Gallium-containing hydroxyapatite for potential use in orthopedics. *Mater Chem Phys.* 2009;117(1):86- 90. doi:10.1016/j.matchemphys.2009.05.046.
12. X. Zhaorong, C. Xiaodong, T. Rongwei, S. Zhending, C. Zhaohong, X. Zhaofan et al, Preparation and characterization of a gallium-loaded antimicrobial artificial dermal scaffold, Materials Science and Engineering C, 2019, vol 105, doi:10.16/j.msec.2019.110063.
13. Qu J, Lu X, Li D, et al. Silver/hydroxyapatite composite coatings on porous titanium surfaces by sol-gel method. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2011;97 B(1):40-48. doi:10.1002/jbm.b.31784.
14. P. Logeswari, S. Silambarasam, J. Abraham et al. Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property, Journal of Saudi Chemical Society, 2015, vol19, doi: 10.1016/j.jscs.2012.04.007.
15. N. Martinez, Obtención de compuesto de hidroxiapatita biocompatible y con actividad antibacteriana potencializada por un efecto sinérgico a partir del dopado con plata y cobre. Tesis del Programa de Maestría de Ciencia y Tecnología de los Materiales, Universidad Autónoma de Coahuila, México. 2018.
16. Y. Chen, Y. Zhang, J. Liu, H. Zhang, K. Wang, "Preparation and antibacterial property of polyethersulfone ultrafiltration hybrid membrane containing halloysite nanotubes loaded with copper ions", Chemical Engineering Journal, 2012, vol 210, doi: 10.1016/j.cej.2012.08.100.
17. J. Paez, U. Cauca, Obtención de Nanopartículas de ZrO₂ Dopado con Y₂O₃ Utilizando Rutas Químicas. *Rev Latinoam Metal y Mater.* 2007;27(2):124-134.
18. C. Silva, C. Santos et al, "Mechanical properties of nanostructured zirconia", Materials science forum, 2010, vol 660, doi: 10.4028/www.scientific.net/MSF.660-661.757.
19. C. Peniche, Y. Solís, N. Davidenko, R. García, Materiales compuestos de quitosana e hidroxiapatita. *Biotechnol Apl.* 2010;27(3).
20. S. Fariborz, H. Amir, S. Mehdi, E. Amirhossein, N. Hiva, W. Ho, S. Mohammadreza, "Hydroxyapatite consolidated by zirconia: applications for dental implant", Journal of composites and compounds, 2020, vol 2, doi: 10.29252/jcc.2.1.4
21. S. Farhikhteh, A. Maghsoudipour, B. Raissi, Synthesis of nanocrystalline YSZ (ZrO₂-8Y₂O₃) powder by polymerized complex method. *Journal of Alloys and Compounds*,491(1-2),402-405.https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2009.10.196
22. M. Charlotte, F. Frankc, S. Verena, D. Philippe, A. Mathieu, Q. Sophie, M. Dominique, M. Jean, B. Bruno, P. Janvier, Characterization and properties of novel Gallium-doped calcium phosphate ceramics, Inorganic chemistry, doi/10.1021/ic2007777, 2011, 50,282.
23. Figueroa A., Manufactura y procesamiento de materiales avanzados cermet base alúmina reforzados con partículas de plata, Universidad Autónoma de estado de México, 40-42, 2017.
24. G. Sierra, A. Echeverría, L. Palacio, C. Saldarriaga, Síntesis y caracterización de un nuevo material tipo fosfato de cobre, revista de la facultad de la ingeniería, Instituto de Química Universidad de Antioquía, 27, 104-109, 2002.
25. T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, Biomaterials, 2006, 27(15): 2907-2915, doi: 10.1016/j.biomaterials, 2006.01.017.
26. M. Hendershot, M. Corvo, S. Vistoft, M. Cadaret, E. McCalla, C. Stevenson, DR. Pohl, Hemolysis, ASTM, 2007.
27. International Standard (ISO), Tests for in vitro cytotoxicity, in: Biological evaluation of medical devices, Turquía, 2009, pp.1-29.
28. D. Brian, A. Dirk, A. Lloyd, D. Raigrodski, "Accelerated aging characteristics of three yttria -stabilized tetragonal zirconia polycrystalline dental materials", The journal of prosthetic dentistry, 2012, vol 108, doi:10.1016/S00223913(12)60166-8.
29. M. Londoño, A. Echevarría, F. De La Calle, Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. *Rev EIA.* 2006;(5):109-118. doi:10.24050/reia.v3i5.152
30. A. Rasha, A. Mohammed, A. Medhat, "In vitro bioactivity, molecular structure and mechanical properties of zirconia-carbonated hydroxyapatite nanobiocomposites sintered at different tempera-

- tures”, *Materials Chemistry and Physics*, 2020, vol 239, doi:10.1016/j.matchemphys.2019.122011.[31]
31. M. Theiszová, S. Jantová, J. Dragúnová, P. Grznárová, M. Palou, Comparison the cytotoxicity of hydroxyapatite measured by direct cell counting and MTT test in murine fibroblast NIH-3T3 cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005;149(2):393-396. doi:10.5507/bp.2005.066.
 32. B. Ekka, S. Nayak, L. Achary, et al. Synthesis of hydroxyapatite-zirconia nanocomposite through sonochemical route: A potential catalyst for degradation of phenolic compounds. *J Environ Chem Eng.* 2018;6(5):6504-6515. doi:10.1016/j.jece.2018.09.026
 33. D. Predoi, Barsan M, E. Andronescu, R. Vatasescu, M. Costache, Hydroxyapatite-iron oxide bioceramic prepared using nano-size powders. *J Optoelectron Adv Mater.* 2007;9(11):3609-3613.
 34. J. Pino, J. Mora, R. Couceiro, C. García, Study of the viability and adhesion of osteoblast cells to bone cements mixed with hydroxyapatite at different concentrations to use in vertebral augmentation techniques. *Rev Española Cirugía Ortopédica y Traumatol (English Ed.* 2015;59(2):122-128. doi:10.1016/j.recote.2015.01.003
 35. N. Ribeiro, S. Sousa, F. Monteiro, Influence of crystallite size of nanophased hydroxyapatite on fibronectin and osteonectin adsorption and on MC3T3-E1 osteoblast adhesion and morphology. *J Colloid Interface Sci.* 2010;351(2):398-406. doi:10.1016/j.jcis.2010.08.013
 36. S. Arce, C. Valencia, G. Alvarado, Obtención de un biocompuesto constituido por fosfato tricálcico y quitosana para ser usado como sustituto óseo en un modelo animal. *Revista cubana de investigaciones biomédicas* 2012;31(3):268-277. doi:10.2454/CNIB.16.26