



**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y TÉRMICA DE UN BIOMATERIAL
COMPUESTO DE ALTA POROSIDAD PHEMA-QUITOSANO-CERÁMICA
(HIDROXIAPATITA)**

**MORPHOLOGICAL AND THERMAL CHARACTERIZATION OF A HIGH POROUS
COMPOSITE OF BIOMATERIAL PHEMA-CHITOSAN-CERAMIC
(HYDROXYAPATITE)**

A.M. Salgado-Delgado¹, Z. Vargas-Galarza^{1*}, R. Salgado-Delgado¹, E. García-Hernández¹, W. N. Hernández-Díaz¹, E. Rubio-Rosas², R. Salgado-Rodríguez³

¹División de Estudios de Posgrado e Investigación/Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Zacatepec, Calzada Tecnológico No. 27, Zacatepec, Morelos, C.P. 62780, MÉXICO.

²Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Prolongación de la 24 Sur y av. San Claudio, Ciudad Universitaria, Col. San Manuel, Puebla, Puebla, C. P. 72570, MÉXICO.

³Centro de Graduados e Investigación de Química, Instituto Tecnológico de Tijuana, Unidad Otay, Blvd. Industrial s/n, Tijuana, Baja California, C. P. 22000, MÉXICO.

Recibido 18 de marzo de 2014; Aceptado 7 de marzo de 2016

Resumen

El polimetacrilato de 2-hidroxietilo (pHEMA) y el Quitosano se combinaron para la obtención de un biomaterial compuesto con cargas de Hidroxiapatita por medio del efecto de gas espumante. Este trabajo reporta la caracterización morfológica del biomaterial compuesto por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) con el cual se analizó la superficie del material y se corroboró la generación de poros, así como la formación de una red interpenetrada tridimensional. Su estabilidad térmica se evaluó por medio de termogravimetría (TGA-DTG). Los resultados obtenidos por SEM indicaron la generación de una alta porosidad y de una red interpenetrada en el material poroso, además los resultados de la estabilidad térmica fueron discutidos.

Palabras clave: pHEMA, quitosano, cerámica, material poroso, red interpenetrada.

Abstract

Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) and chitosan were combined to obtain a biocomposite material with fillers of Hydroxyapatite through foaming gas effect. In this paper the morphological characterization of the composite biomaterial by scanning electron microscopy (SEM) to analyze the generation of pores is reported, as well as a three-dimensional interpenetrating network. Thermal stability was evaluated by analysis of thermogravimetry (TGA-DTG). The results obtained by SEM indicate the generation a high porosity and the interpenetrated network in the porous material, in addition to the discussion of the results in terms of the thermal stability.

Keywords: pHEMA, chitosan, ceramics, porous material, interpenetrating network.

1 Introducción

Diferentes materiales han sido investigados para aplicaciones en ingeniería tisular elaborados de metales, cerámicas y polímeros, estos últimos al igual que con todos los materiales implantados en el cuerpo deben ser biocompatibles. El uso de los polímeros tiene otras ventajas, por ejemplo que los materiales deben ser moldeables o polimerizables *in situ* para asegurar una buena integración en el área defectuosa. Los andamios poliméricos desempeñan un

papel fundamental en la ingeniería tisular a través de la siembra de células, la proliferación y la formación de nuevo tejido en tres dimensiones, lo cual promete abrir una línea de investigación en el campo de la ingeniería sobre el diseño de tejidos. Algunos parámetros importantes a considerar en el diseño de andamios son: la porosidad, el tamaño de poro y el área de superficie, así como sus características arquitectónicas tales como la forma de los poros, la morfología de

* Corresponding author. E-mail: zullyvag@hotmail.com

los poros y la interconectividad entre los poros de los materiales. Estos son importantes para lograr la siembra celular, la migración, crecimiento, transporte de masa y la formación de tejido (Pieliachowska y col. 2010 y Okamoto y col. 2013).

Los polímeros y materiales biocerámicos tales como Hidroxiapatita (HA), Fosfato tricálcico, y biovidrio pueden formar compuestos orgánicos/inorgánicos biodegradables y biocompatibles que se pueden utilizar como injertos óseos sintéticos. Estos son importantes para la reparación y regeneración ósea confiriendo propiedades estructurales y químicas que proporcionan un entorno bioquímico para promover respuestas celulares y la integración del tejido. Para cumplir con los requisitos de estas funciones, los materiales híbridos (orgánicos/inorgánicos sintéticos) más deseables deben ser biocompatibles, porosos (con un diámetro de al menos 100 nm), además de ser frente a la hidrólisis o enzimas, biodegradables dentro de un tiempo específico, también deben ser osteoconductivos y osteoinductores, estas condiciones lograrían que las células puedan unirse a los biomateriales híbridos, proliferar, migrar y diferenciarse (Huang y col. 2013).

El propósito del presente trabajo consiste en emplear pHEMA, Quitosano e Hidroxiapatita en la obtención de un material compuesto, que combina sus propiedades naturales dentro de una red tridimensional interpenetrada generada por efecto de gas espumante y la evaluación de su estructura morfológica, así como la estabilidad térmica del mismo.

2 Antecedentes

El desarrollo de nuevos biomateriales para propósitos de la ingeniería tisular ha sido de gran interés para la ciencia e ingeniería. Durante las últimas décadas, diferentes biomateriales de origen biológico o sintético han sido diseñados con la intención de proporcionar la matriz extracelular a andamios para la formación de hueso nuevo (Rodrigues y col., 2003). Estos andamios son construcciones en tres dimensiones (3D) que se implantan en el cuerpo humano, lo que lleva a la integración y aceptación en el organismo.

Los polimetacrilatos son frecuentemente utilizados para aplicaciones médicas y farmacéuticas (Nita y col. 2013). El Polimetacrilato de 2-hidroxietilo (pHEMA) es un polímero sintético versátil con propiedades adecuadas para una amplia gama de

aplicaciones, en particular aplicaciones biomédicas (Figueiredo y col. 2013), incluyendo lentes de contacto (Kopecek, 2009), córneas artificiales (Sasaki y col. 2009), andamios degradables para la ingeniería tisular (Atzet y col. 2008) y sistemas de administración de fármacos (Horák y col. 2008).

El Quitosano es un polímero catiónico, con una estructura de polisacárido, comúnmente encontrado en la naturaleza. Sus propiedades químicas y biológicas son interesantes por sus potenciales aplicaciones en diferentes áreas, tales como, la medicina, agricultura e industria. La principal razón de su importancia es debido a sus propiedades intrínsecas como la biocompatibilidad, biodegradabilidad, nula toxicidad, bioadhesivo, así como su actividad antimicrobiana (Ávila y col. 2012).

La Hidroxiapatita (HA) es un importante biomaterial de origen natural, es un mineral con una estructura hexagonal que se compone de grupos de Fosfatos de calcio. Estudios cristalográficos y químicos han demostrado que la HA sintética es similar al componente inorgánico natural que se encuentra en la matriz ósea y en los dientes. Debido a esta similitud, ha sido de interés en la investigación emplear la HA sintética como sustituto de hueso en varias aplicaciones biomédicas. Existen varias ventajas significativas en el uso de la HA sintética en aplicaciones de ingeniería tisular, ya que tiene una buena biocompatibilidad, propiedades de bioactividad, biodegradabilidad lenta *in situ* y también ofrece una buena osteoconductividad. Estas propiedades son muy importantes, ya que el tejido óseo se somete constantemente a regeneración (Poinern y col. 2011).

3 Materiales y métodos

En este trabajo se utilizó Metacrilato de 2-Hidroxietilo (HEMA, CAS No. 868-77-9), N,N'-metilenbisacrilamida (BIS, CAS No. 110-26-9), Pluronic® F127 (PF127, CAS No. 9003-11-6), Persulfato de Amonio (APS, CAS No. 7727-54-0), N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED, CAS No. 110-18-9), Hidroxiapatita (HA, CAS No. 12167-74-7), Carbonato de Sodio hidratado (NaHCO₃, CAS No. 97323-76-2), nanoHidroxiapatita (nHA, CAS No.12167-74-7), Quitosano (CAS No. 9012-76-4), de Sigma Aldrich. La Hidroxiapatita es de grado reactivo en polvo y la nanoHidroxiapatita tiene un tamaño de partícula <200nm.

3.1 Obtención del material compuesto

Para la obtención de los materiales compuestos pHEMA, pHEMA-Quitosano, pHEMA-Quitosano-HA y pHEMA-Quitosano-nHA utilizando el NaHCO₃ como agente espumante, se mezclaron los componentes que se muestran en la Tabla 1, y de acuerdo con la metodología descrita por Damla Çetin y col. (2011) se utilizaron Bis, Pluronic® F127, APS y como catalizador TEMED. Todos los componentes fueron mezclados en baño ultrasónico, en tubos de ensayo a temperatura ambiente y presión atmosférica.

3.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología y estructuras porosas de los materiales compuestos se examinaron por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), utilizando un microscopio electrónico de barrido marca JEOL, modelo JSM - 6010LA (condiciones del equipo SEI, 4 y 10 kV), previamente al análisis SEM las muestras se sometieron a un proceso de secado a vacío.

3.3 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

El equipo de FTIR utilizado fue marca PerkinElmer modelo Spectrum Two. Esta técnica permitió identificar la presencia de grupos funcionales en las materias primas y los productos. Los intervalos de medición: 4000 cm⁻¹ a 650 cm⁻¹ en el modo de transmitancia con 16 números de barridos en una resolución 4 cm⁻¹.

3.4 Análisis Termogravimétrico (TGA-DTG)

Los termogramas TGA-DTG obtenidos para la determinación de transiciones térmicas del material compuesto se llevaron a cabo en un equipo NETZSCH

INSTRUMENTS, modelo STA 449F3 JUPITER en crisoles de alúmina y un horno de SiC. La rampa de calentamiento fue de 25 a 800 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

4 Resultados y discusión

Los materiales compuestos basados en pHEMA, como matriz polimérica y obtenidos por polimerización por radicales, se secaron a vacío, resultando un material rígido, blanco y liviano. La porosidad generada en el material se llevó a cabo por el efecto de gas espumante al generar burbujas de gas de CO₂, siendo estos poros observables por microscopía electrónica de barrido. Se utilizó Quitosano como agente antimicrobiano. Para el incremento de la bioactividad del hidrogel poroso se utilizó Hidroxiapatita y nanoHidroxiapatita respectivamente.

4.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

En la Fig. 1 (a, b, c y d) se presentan las imágenes que se obtuvieron por la técnica de análisis de SEM, en las que se observa la formación de los poros en los biomateriales compuestos pHEMA y pHEMA-Quitosano, estos poros presentan diámetros que oscilan entre los 100 y 200 μm aproximadamente. Del mismo modo, por medio de esta técnica de análisis, se puede observar en el interior de estos poros la formación de poros más pequeños con diámetros dentro de un intervalo de 2 a 10 μm (ver Fig. 1c y 1d). Esto evidencia la formación de una red interpenetrada en el material compuesto pHEMA-Quitosano (Das N., 2013). Esto debido a que el pHEMA se sintetizó en presencia del Quitosano solubilizado en ácido acético y no existió una interacción química entre los grupos funcionales de cada uno de estos componentes, como se observa en el análisis de FTIR (ver sección 4.2).

Tabla 1. Componentes de los Materiales Compuestos pHEMA-Quitosano-Hidroxiapatita en baño ultrasónico

Componentes	Materiales Compuestos			
	pHEMA	pHEMA-Quitosano	pHEMA-Quitosano-HA	pHEMA-Quitosano-nHA
HEMA	750 μL	750 μL	750 μL	750 μL
Quitosano 2%	--	500 μL	500 μL	500 μL
Hidroxiapatita	--	--	170 mg	--
nanohidroxiapatita	--	--	--	170 mg

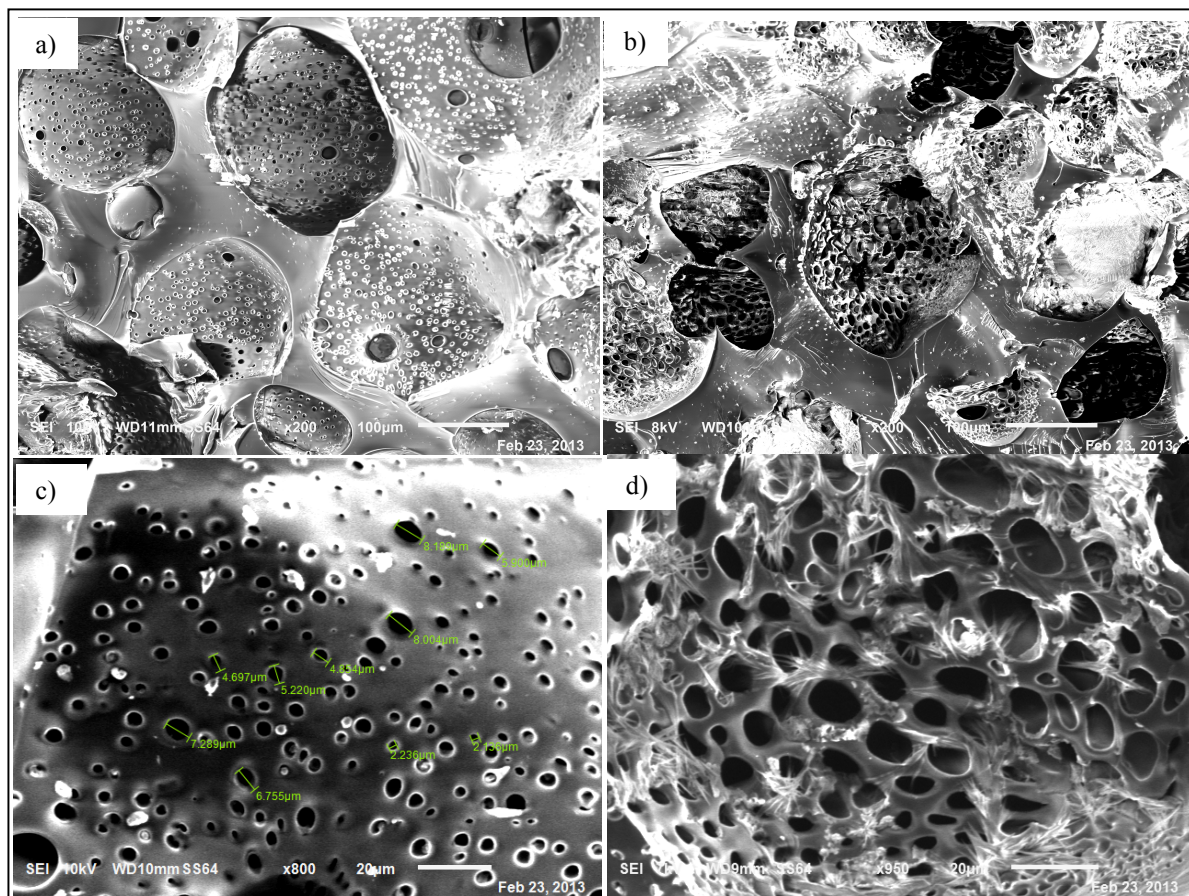


Fig. 1. Material compuesto a) pHEMA-200x, b) pHEMA-800x, c) pHEMA-Quitosano-200x y d) pHEMA-Quitosano-950x.

En la Fig. 2 (a, b, c y d) se muestran las micrografías de los materiales compuestos pHEMA-Quitosano-HA y pHEMA-Quitosano-nHA, donde se observa la incorporación del material cerámico, tanto de tamaño micrométrico como nanométrico respectivamente, puede observarse en todos los casos que la red interpenetrada porosa del pHEMA-Quitosano se mantiene sin presentar modificaciones en su estructura química, además de la distribución de la HA y nHA sobre la superficie del material, siendo evidente en ambos aumentos 300 y 1100 x. En la Fig. 2d se evidencia el depósito del quitosano en la superficie y dentro de los poros del material.

4.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Los materiales pHEMA, pHEMA-Quitosano, pHEMA-Quitosano-HA, pHEMA-Quitosano-nHA,

HA y nHA, fueron analizados por FTIR. En los espectros obtenidos, mostrados en la Fig. 3, se observan las vibraciones correspondientes a enlaces O-H presentes en el pHEMA y Quitosano, las cuales ocurren alrededor de $3500-3000\text{ cm}^{-1}$, así como también las vibraciones del grupo funcional C=O que pertenecen al pHEMA y Quitosano a 1700 cm^{-1} , un pico característico de ambos compuestos. El pico presente a 1100 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de los enlaces C-O-C presentes en el pHEMA y Quitosano. La región de $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ corresponde a las vibraciones de CH_2 y CH_3 . La señal del grupo $-\text{NH}_2$ de la molécula del Quitosano se presenta a 1625 cm^{-1} .

El espectro de FTIR muestra los picos de absorción característicos de la Hidroxiapatita, además de la presencia de Carbonato. Las bandas a 1050 y 950 cm^{-1} son asignadas a las vibraciones de los iones PO_4^{3-} y la observada a 1120 cm^{-1} al anión HPO_4^- .

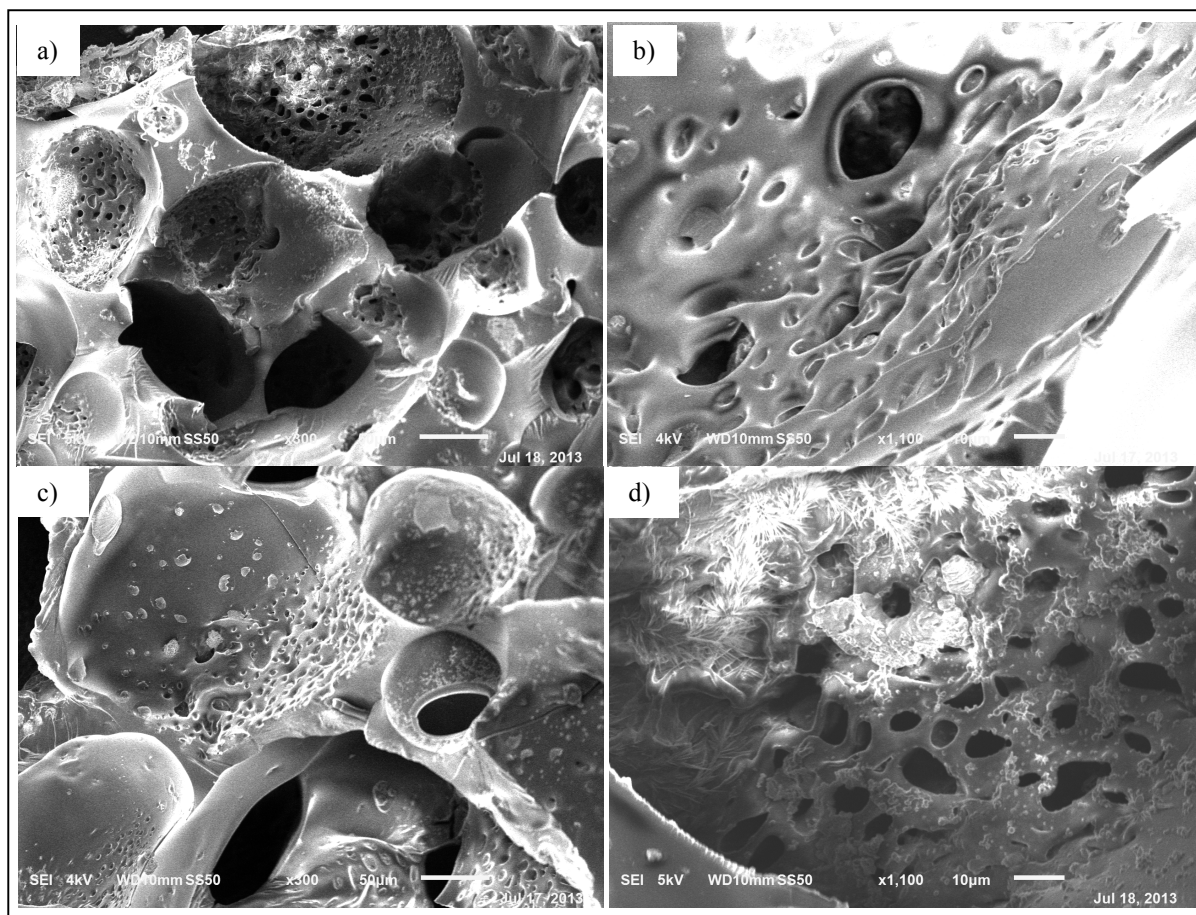


Fig. 2. Material compuesto a) pHEMA-Quitosano-HA-300x, b) pHEMA-Quitosano-HA-1100x, c) pHEMA-Quitosano-nHA-300x y d) pHEMA-Quitosano-nHA-1100x.

La presencia de bandas en el intervalo de 1500 a 1400 cm^{-1} , conjuntamente con la banda a 870 cm^{-1} , indica la presencia de iones carbonato en la hidroxiapatita. Este análisis evidencia que las sustancias presentes en el material compuesto mantienen sus grupos funcionales característicos después de la obtención del material compuesto, por lo que se mantienen sus propiedades naturales.

4.3 Análisis Termogravimétrico (TGA-DTG)

La estabilidad térmica del material obtenido se determinó por análisis termogravimétrico (TGA). Este estudio es de gran importancia debido a las posibles aplicaciones del material, donde puede ser sometido a temperaturas relativamente altas, como lo es la esterilización, mecanismo que es necesario en el empleo de materiales biomédicos (Figueiredo y col.,

2013). Dicho análisis se realizó desde temperatura ambiente (21 $^{\circ}\text{C}$) alcanzando una temperatura final de 800 $^{\circ}\text{C}$. En todos los casos, la pérdida de peso se lleva a cabo en 3 etapas, donde dos de ellas se atribuyen a la descomposición del material compuesto.

En la Fig. 4 se puede observar la pérdida de peso en función de la temperatura de los materiales pHEMA, pHEMA-Quitosano, pHEMA-Quitosano-HA y pHEMA-Quitosano nHA. En el intervalo de temperatura de 27 - 400 $^{\circ}\text{C}$, se observa cierta similitud en los cambios del porcentaje de pérdida en peso y estabilidad térmica.

En la misma figura se muestra que la primera etapa de descomposición ocurre dentro del intervalo de 27 - 200 $^{\circ}\text{C}$, la pérdida de masa en aproximadamente 100 $^{\circ}\text{C}$ es asociada con agua no enlazada, así como también a la pérdida de algunos compuestos volátiles. La segunda y tercer etapa dentro del intervalo de 200 - 500 $^{\circ}\text{C}$, corresponden a la pérdida de peso de las redes

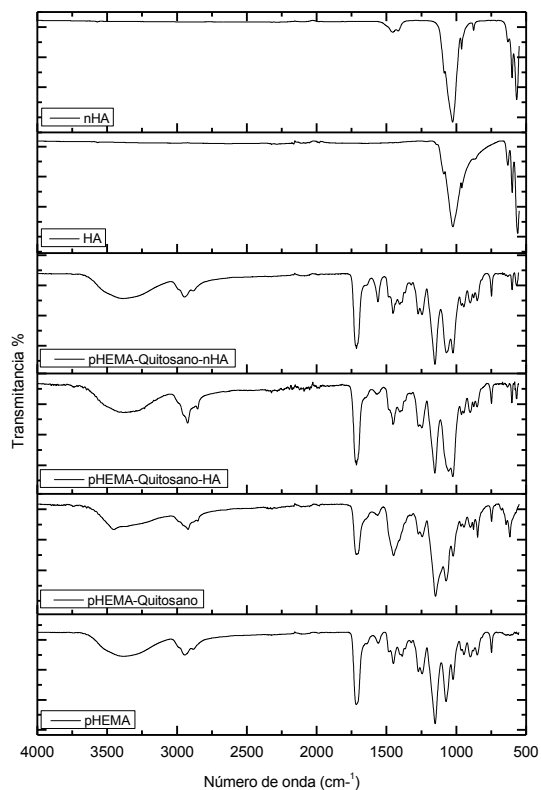


Fig. 3. FTIR de pHEMA, pHEMA-Quitosano, pHEMA-Quitosano-HA, pHEMA-Quitosano-nHA, HA y nHA.

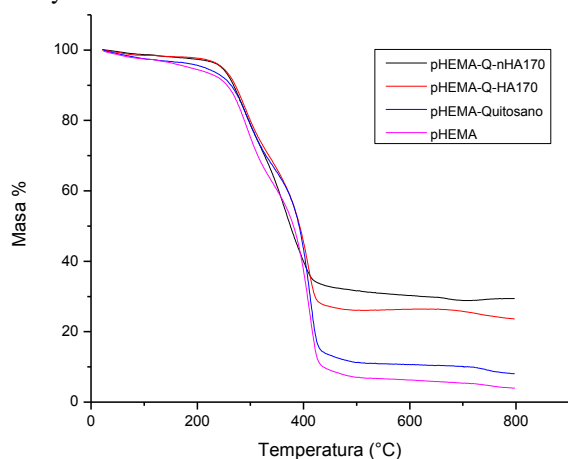


Fig. 4. TGA de material compuesto pHEMA, pHEMA-Quitosano, pHEMA-Quitosano-HA y pHEMA-Quitosano-nHA

poliméricas orgánicas debido a la degradación tanto del pHEMA como el Quitosano. La segunda etapa (290-300 °C) indica el rompimiento de la red tridimensional interpenetrada, debido a que las partículas de la HA y nHA separan las redes de los

polímeros haciendo un desplazamiento a temperaturas menores de degradación, seguido de la degradación total del material orgánico (360-410 °C). Además se evidencia un porcentaje de remanente mayor (23.64 y 29.4 %) por la presencia del material cerámico en las muestras que contienen HA y nHA debido a su carácter inorgánico.

En la Fig. 5 se observa el resultado de análisis DTG de los materiales obtenidos pHEMA, pHEMA-Quitosano, pHEMA-Quitosano-HA y pHEMA-Quitosano nHA, en la cual se evidencian claramente dos etapas en la degradación entre los 200 y 500 °C, cada una de estas etapas están asociadas a la parte orgánica de los materiales, corroborando los resultados discutidos en el TGA.

En la Tabla 2, se observa que los materiales compuestos pHEMA-Quitosano-HA y pHEMA-Quitosano-nHA tienden a ser menos hidrofílicos con la adición de la cerámica, debido a que la pérdida de agua no enlazada a los 100 °C es menor en porcentaje. Estas muestras presentan menor temperatura de descomposición en las dos etapas señaladas, 291.475 y 402.475 °C para pHEMA-Quitosano-HA y 291.26 y 367.26 °C para pHEMA-Quitosano-nHA, observados entre los 200 y 400 °C, comparado con las muestras preparadas sin HA y nHA. Además de que se evidencia un porcentaje de remanente mayor (23.64 y 29.4%) debido a la cerámica presente en las muestras que contienen HA y nHA.

La disminución de la temperatura de degradación se debe a la adición de HA y nHA, siendo más evidente para la nHA, ya que la mayor parte de las cadenas de la red del material se encuentran más separadas debido a un aumento en el número de espacios entre cadenas por su tamaño de partícula.

Conclusiones

De acuerdo a las imágenes obtenidas mediante la microscopía electrónica de barrido, se observó que la porosidad generada por el método de gas espumante, da como resultado una alta distribución de tamaños de poros en los materiales compuestos pHEMA-Quitosano-HA y pHEMA-Quitosano-nHA, generando así una red interpenetrada súper porosa. Los espectros de FTIR demostraron que no hubo una interacción química entre los grupos funcionales de cada uno de los componentes del material. Mientras que en el análisis termogravimétrico se evidenció un aumento en la estabilidad del material con la adición de la cerámica (HA y nHA), lo cual indica que el material

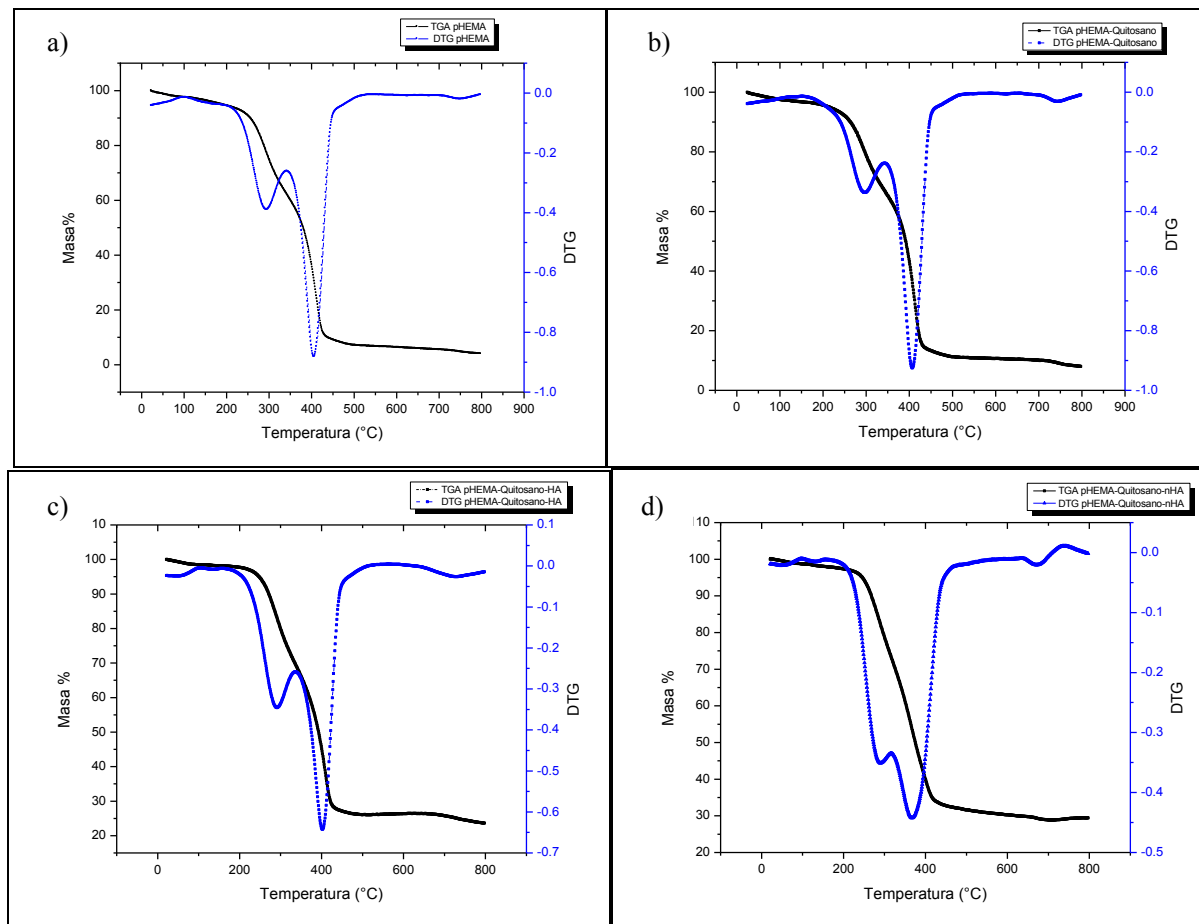


Fig. 5. DTG de materiales compuestos a) pHEMA, b) pHEMA-Quitosano, c) pHEMA-Quitosano-HA y d) pHEMA-Quitosano-nHA.

Tabla 2. Temperatura de degradación de las muestras

Muestra	% Pérdida de masa a 100° C	Temperatura °C	Temperatura °C	% Remanente
pHEMA	2.52	294.956	406.969	3.95
pHEMA-Quitosano	2.47	298.26	407.26	8.03
pHEMA-Quitosano-HA	1.53	291.475	402.475	23.64
pHEMA-Quitosano-nHA	1.29	291.26	367.26	29.4

puede ser sometido a tratamientos de esterilización, para una aplicación futura en el área médica, como lo es la esterilización ya sea en autoclave o calor seco, en donde las temperaturas utilizadas son de 121 y 180 °C, respectivamente (Hofmann y col., 2014).

Referencias

- Atzet S., Curtin S., Trinh P., Bryant S., Ratner B. (2008). Degradable poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-copolycaprolactone hydrogels for tissue engineering scaffolds. *Biomacromolecules* 9,

3370-3377.

- Ávila A., Bierbrauer K., Pucci G., López-González M., Strumia M. (2012). Study of optimization of the synthesis and properties of films based on grafted chitosan. *Journal of Food Engineering* 109, 752-761.
- Çetin D., Kahraman A. S., Gümüşderelioglu M. (2011). Novel scaffolds based on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) superporous hydrogels for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science* 22, 1157-1178.
- Das N. (2013). Preparation methods and properties of hydrogel: a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* 5, 112-117.
- Figueiredo A. G. P. R., Figueiredo A. R. P., Alonso-Varona A., Fernandes S. C. M., Palomares T., Rubio-Azpeitia E., Barros-Timmons A., Silvestre A. J. D., Neto C. P., Freire C. S. R. (2013). Biocompatible bacterial cellulose-poly(2-hydroxyethyl methacrylate) nanocomposite films. *BioMed Research International* 2013, Pp. 14.
- Hofmann S., Stok K.S., Kohler T., Meinel A. J., Müller R. (2014). Effect of sterilization on structural and material properties of 3-D silk fibroin scaffolds. *Acta Biomaterialia* 10, 308-317.
- Horák D., Hlídková H., Hradil J., Lapčíková M., Šlouf M. (2008) Superporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based scaffolds: preparation and characterization. *Polymer* 49, 2046-2054.
- Huang J., Zhao D., Dangaria S. J., Luan X., Diekwisch T.G.H., Jiang G., Saiz E., Liu G., Tomsia A. P. (2013). Combinatorial design of hydrolytically degradable, bone-like biocomposites based on PHEMA and hydroxyapatite. *Polymer* 54, 909-919.
- Kopecek J. (2009) Hydrogels: from soft contact lenses and implants to self-assembled nanomaterials. *Journal of Polymer Science A* 47, 5929-5946
- Nita L. E., Chiriac A. P., Nistor M., Budtova T. (2013). Upon the delivery properties of a polymeric system based on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) prepared with proactive colloids. *Journal of Biomaterials and Nanobiothechnology* 4,357-364.
- Okamoto M., John B. (2013). Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. *Progress in Polymer Science* 38, 1487-1503.
- Pielichowska K., Blazewicz S., (2010). Bioactive polymer/hydroxyapatite (nano)composites for bone tissue regeneration. *Advances in Polymer Science* 232, 97-207.
- Poinern G.J.E., Brundavanam R., Thi Le X., Djordjevic S., Prokic M., Fawcett D. (2011). Thermal and ultrasonic influence in the formation of nanometer scale hydroxyapatite bio-ceramic. *International Journal of Nanomedicine* 6, 2083-2095.
- Rodrigues C.V.M., Serricella P., Linhares A.B.R., Guerdes R.M., Borojevic R., Rossi M.A., Duarte M.E.L., Farina M. (2003). Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials* 24, 4987-4997.
- Sasaki S., Funamoto S., Hashimoto Y., Kimura T., Honda T., Hattori S., Kobayashi H., Kishida A., Mochizuki M. (2009). *In vivo* evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas. *Molecular Vision* 15, 2022-2028.