

Caracterización de una biohidroxiapatita tratada con radiación gamma para aplicaciones biomédicas

Emma Castro^{1,*}, Alcides López^{2,3}, Bertha Ramos⁴, Johnny Vargas¹, Mónica Vivanco¹,
Paula Olivera²

¹ Instituto Peruano de Energía Nuclear, Dirección de Servicios, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

² Instituto Peruano de Energía Nuclear, Dirección de Investigación y Desarrollo, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

³ Universidad Nacional de Ingeniería, Facultad de Ciencias, Av. Túpac Amaru 210 Lima 25, Perú

⁴ Instituto Peruano de Energía Nuclear, Planta de Producción de Radioisótopos Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

Resumen

Debido a su excelente biocompatibilidad, bioactividad y osteoconducción, la hidroxiapatita es un material que se utiliza ampliamente en cirugía ortopédica, traumatología, odontología y cirugía maxilo-facial. El presente trabajo tiene como propósito caracterizar una biohidroxiapatita (BHA) esterilizada por radiación gamma y tratada a las dosis de 0, 25, 50, 100, 200 y 500 kGy, utilizando técnicas gravimétricas, espectroscopía FTIR, difracción de rayos X, fluorescencia de rayos X, microscopía electrónica de barrido y pruebas organolépticas. Se realizaron pruebas dosimétricas para la irradiación del producto y la esterilidad de la BHA se comprobó mediante pruebas microbiológicas. Los resultados de las pruebas de caracterización concluyen que la BHA irradiada a 25 kGy es apropiada para ser utilizada en aplicaciones médicas.

Abstract

Hydroxyapatite is a material that is used for orthopaedic surgery and traumatology as well as for odontology and maxilo-facial surgery due to its biocompatibility, bioactivity and osteoconduction. To be used in patients, hydroxyapatite must be sterile and thus, previously should undergo an sterilization process. This work aims to characterize a biohydroxyapatite (BHA) sterilized by gamma radiation, treated at doses of 25, 50, 100, 200 y 500 kGy, using gravimetric techniques, FT-IR spectroscopy, X-ray diffraction and fluorescence, scanning electron microscopy as well as organoleptic tests. For product irradiation, dosimetric tests were performed and the sterility of the product was verified through microbiological tests. Results of characterization tests concluded that the BHA irradiated at 25 kGy is appropriate for medical applications.

1. Introducción

La biohidroxiapatita (BHA) es el principal componente inorgánico de los huesos, encontrándose también en los dientes. Su fórmula química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, su origen puede ser natural en forma de mineral: humano, bovino, equino, coralino, ficógeno, y en forma sintética puede ser hidroxiapatita pura (HA): cerámico o no cerámico [1]. La BHA y la HA han sido muy estudiadas y debido a sus propiedades de biocompatibilidad son utilizadas en el campo de la biomedicina, principalmente como sustituto óseo.

En la actualidad, para la reparación ósea, los injertos de hueso autólogo son considerados los "estándares de oro" de los sustitutos óseos; sin embargo, su limitada

disponibilidad y morbilidad asociada a la procuración del hueso de sitios donantes han orientado a la búsqueda de materiales alternativos [2]. Así, la BHA es uno de los biocerámicos más utilizados debido a sus excelentes propiedades biocompatibles, antiinflamatorias, osteoconductoras, promotoras del crecimiento de hueso nuevo, capacidad de reabsorción por el cuerpo [3] y porque además puede ser obtenida de diferentes fuentes.

La BHA se utiliza en cirugía máxilo-facial, periodontología, ortopedia y traumatología; para el relleno de vacíos óseos creados por quistes, tumores y traumas. De igual manera, se utiliza en intervenciones quirúrgicas como: aumento de rebordes alveolares atróficos,

* Correspondencia autor: ecastro@ipen.gob.pe

cubierta de implantes metálicos y cirugía ortognática [4-6].

Para que la BHA pueda ser aplicada en la práctica médica requiere estar estéril y la radiación gamma, proveniente del Cobalto-60, es un método eficaz para esterilizar productos para uso biomédico. Una de sus ventajas frente a otros métodos de esterilización es su gran capacidad de penetración y que el producto puede tratarse en su empaque final. Igualmente, el aumento de la temperatura durante el procesamiento es insignificante, por lo que es posible tratar productos sensibles al calor [7, 8]. El propósito de este trabajo es caracterizar una biohidroxiapatita (BHA) esterilizada por radiación gamma y tratada a las dosis de 0, 25, 50, 100, 200 y 500 kGy, utilizando técnicas gravimétricas, espectroscopía FTIR, difracción de rayos X, fluorescencia de rayos X, microscopía electrónica de barrido y pruebas organolépticas para determinar las propiedades físico-químicas y la dosis de irradiación apropiada en el producto para ser utilizado en aplicaciones médicas.

2. Metodología

Se trabajó con una BHA comercial de origen bovino en forma granulada, que requería esterilidad y su caracterización físico-química para su posterior uso biomédico.

2.1 Tratamiento de la muestra para su irradiación

Se envasó en cada vial de vidrio tipo I, la cantidad de 2 gramos de producto en una cabina de flujo laminar.

2.2 Dosimetría e irradiación de las muestras

Las pruebas dosimétricas se realizaron en los laboratorios de dosimetría de IPEN, utilizando el método Fricke como dosímetro de referencia, según la Norma ASTM E1026-04 [9] y Etanol Clorobenceno (ECB) como dosímetro de rutina según la Norma ISO/ASTM 51538:2002 (E) [10].

Los equipos utilizados fueron: el irradiador gamma modelo Gammacell 220 Excel de la Nordion Inc. de Canadá con fuentes de Co-60 con una actividad de 23984 Ci al 2003; y el Espectrofotómetro Thermo Scientific UV-Vis., modelo Evolution. Las lecturas de la absorbancia de los dosímetros Fricke

irradiados se midieron a una longitud onda de 303 nm. Para el control de la dosis, se colocaron con las muestras de BHA, dosímetros de etanol clorobenceno cuya conductividad luego de irradiados, se midió con el equipo Oscilótrotor/TRIEM. Las dosis de irradiación aplicadas fueron 0, 25, 50, 100, 200 y 500 kGy.

2.3 Caracterización de la BHA

2.3.1 Análisis microbiológicos

El análisis microbiológico incluyó la prueba de esterilidad a muestras de BHA irradiadas a 25 kGy y se realizó de acuerdo con los procedimientos establecidos en la US Pharmacopea [11].

Los equipos que se utilizaron para la realización de este análisis fueron: Autoclave Raypa AES-75 Dry, Estufa Incubadora VWR Scientific, Balanza toploading Mettler 682B, Agitador magnético Stuart Scientific, Baño maría Tecam, Shaker Orbital Labline, Agitador de tubos Fisher y campana de Flujo Laminar Envair. Los medios de cultivo utilizados fueron: Caldo Casoy y Caldo Tioglicolate de Merck.

2.3.2 Determinación del contenido de humedad

La prueba se realizó para medir el contenido de agua en las muestras de BHA irradiadas a 0, 25, 50 y 100 kGy. Se utilizaron los siguientes equipos: Balanza Analítica Fisher XA, Estufa de convección al vacío Fisher Isotemp Model 281 y Desecador. La temperatura de secado fue de 110 °C, El método utilizado fue el de pérdida de peso.

2.3.3 Espectroscopia Infrarroja con Transformadas de Fourier FTIR

Esta técnica se empleó para observar y registrar los grupos funcionales de la BHA de la muestra control y las irradiadas a 25, 50, 100, 200 y 500 kGy, usando para ello el Espectrómetro infrarrojo Nicolet, modelo 6700, accesorio ATR (Attenuated Total Reflection). Los parámetros de adquisición fueron: número de escaneos: 32; resolución: 8 cm⁻¹, rango de frecuencia: 500 a 4000 cm⁻¹, modo: absorbancia y una temperatura de 24.5 °C. Para el procesamiento de los espectros se utilizó el software OMNICSpectra.

2.3.4 Difracción de rayos X

Estas pruebas se realizaron para determinar los posibles cambios de la estructura cristalina de las muestras de BHA, cuando son irradiadas a 0, 25, 50, 100, 200 y 500 kGy. Para ello, se ha usado el Difractómetro Bruker Miniflex II con los siguientes parámetros de medición: paso angular de 0.02° velocidad de barrido 6° por minuto, ángulos de 8° a 52° y 30 kV de voltaje de aceleración.

2.3.5 Fluorescencia de rayos X

Las pruebas se realizaron usando dos sistemas: Uno, excitado por una fuente de Cd-109 de 25 mCi, y el otro excitado por un tubo de rayos X con Gd como blanco y un set de blancos secundarios de Al, Ti, Fe, Ge, Zr, Mo, Ag, Al₂O₃. En ambos casos se utilizaron detectores de alta resolución, marca CANBERRA, Modelo SL 30165 (Resolución: 165 eV para 5.89 keV) y Modelo GUL0035P (Resolución: 145 eV para 5.89 keV), respectivamente [12,13].

2.3.6 Análisis de propiedades organolépticas

Estas pruebas se realizaron para evaluar propiedades como el olor, color y apariencia en la BHA irradiada a las dosis de 0, 25, 50, 100, 200 y 500 kGy. Se determinaron cambios en el color utilizando el software ITEM [14].

2.3.7 Análisis morfológico por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

Las morfologías de las BHA irradiadas a las dosis de 0, 200 y 500 kGy se observaron con el Microscopio Electrónico de Barrido Philips S500, a 15000X.

3. Resultados y Discusión

3.1 Dosimetría e irradiación de las muestras de BHA

De acuerdo con la dosimetría Fricke realizada, los resultados fueron: tasa de dosis mínima: 4.1933 kGy/h y tasa de dosis máxima 6.9657 kG/h. La uniformidad de dosis (UD) fue de 1.66. La lectura de los dosímetros de etanol clorobenceno, colocados en el sitio de dosis mínima al irradiar las muestras de la BHA a las diferentes dosis,

indicaron variaciones menores al 6 %. La tasa de dosis hallada con el dosímetro Fricke es adecuada para la irradiación de los productos y la variación del dosímetro de etanol clorobenceno también se encuentra en el rango adecuado.

3.2 Análisis microbiológicos

El ensayo microbiológico en la BHA, demostró que a la dosis de 25 kGy, el producto queda estéril, es decir libre de carga microbiana. Por lo que esta dosis resultó siendo suficiente para esterilizar la BHA.

3.3 Determinación del contenido de humedad

La Tabla 1 muestra los resultados del contenido de humedad de las muestras de BHA irradiadas a diferentes dosis.

Tabla 1. Contenido de humedad de la HA irradiada.

Dosis (kGy)	% de Humedad
0	2.40 ±0.15
25	2.39 ±0.17
50	2.39±0.15
100	2.37±0.14
200	2.37±0.14
500	2.36±0.16

Se puede observar que la humedad disminuye muy ligeramente a medida que aumenta la dosis.

3.4 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier FTIR

En la Figura 1 se observa la secuencia comparativa de los 6 espectros FTIR adquiridos de la HA irradiada a diferentes dosis. Se observan ligeros cambios a 876 cm⁻¹. Para una mejor visualización de este efecto se ha reducido el rango de frecuencias de 800 cm⁻¹ a 930 cm⁻¹ y para descubrir las características espectrales solapadas, que no pueden resolverse mediante los datos graficados directamente, se ha aplicado la deconvolución de Fourier a los espectros de las muestras irradiadas entre 0 y 500 kGy (Ver Figura 2). Se puede apreciar que las frecuencias oscilatorias de 863, 888 y 910 cm⁻¹ de la muestra sin irradiar casi desaparecen por el efecto de la irradiación gamma a una dosis de 500 kGy, al mismo tiempo la frecuencia de 874 cm⁻¹ se hace más pronunciada a dicha dosis, sufriendo un

ligero corrimiento a 877 cm^{-1} .

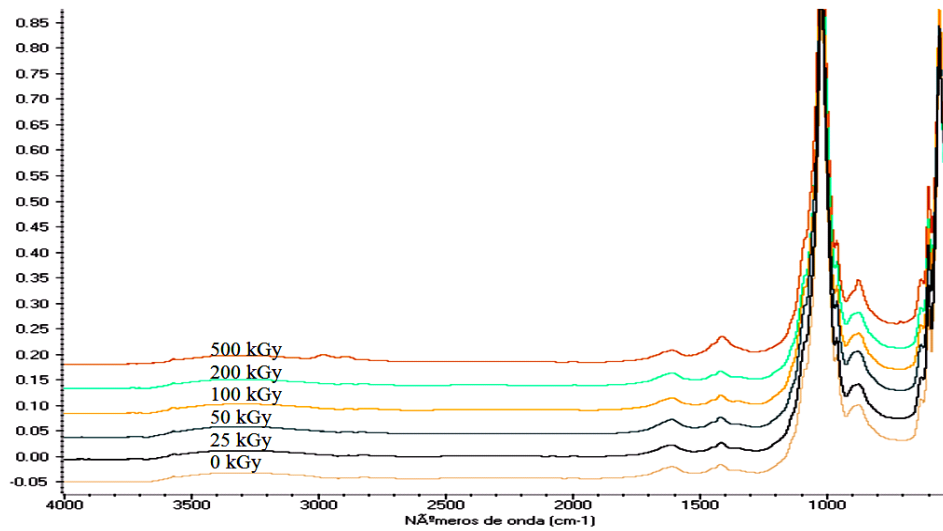


Figura 1. Espectro de absorción FTIR de las 6 muestras de BHA irradiadas entre 0 y 500 kGy.

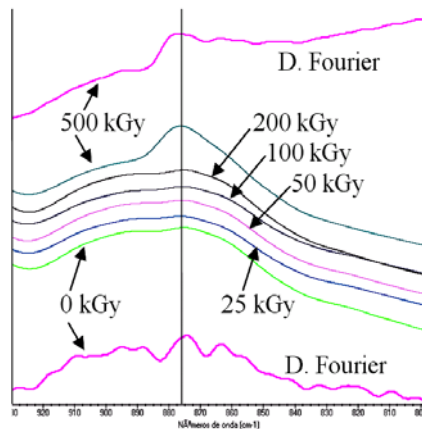


Figura 2. Comparación de los espectros FT-IR de muestras de HA en gránulos tratadas entre 0 y 500 kGy.

El cambio más importante ocurre alrededor de los 876 cm^{-1} , frecuencia que corresponde al enlace C-O del CO_3^{2-} y que se hace más definida a medida que la dosis se incrementa hasta 500 kGy. Este cambio ha sido reportado y corresponde al incremento del CO_3 en la matriz de la HA [15, 16].

En la Tabla 2 se observan las bandas de absorción de la BHA no irradiada e irradiadas hasta 500 kGy. Estas corresponden a las bandas típicas de la HA.

Tabla 2. Bandas de absorción identificadas por espectroscopia FTIR en muestras de BHA.

Número de Onda (cm^{-1})	Asignación
1608	Carbonato (CO_3^{2-})
1418	Carbonato (CO_3^{2-}), tipo B
1021	Fosfato (PO_4^{3-})
962	Fosfato (PO_4^{3-})
876	Carbonato (CO_3^{2-})
599	Fosfato (PO_4^{3-})
559	Fosfato (PO_4^{3-})

3.5 Difracción de rayos X

A bajos ángulos del patrón de difracción de rayos X se observaron cambios en la estructura cristalina de la BHA irradiada desde 200 a 500 kGy. En la figura 3 se aprecia el decremento de la cristalinidad del pico (100) lo cual significa un ligero deterioro de la cristalinidad en dicha dirección cristalográfica.

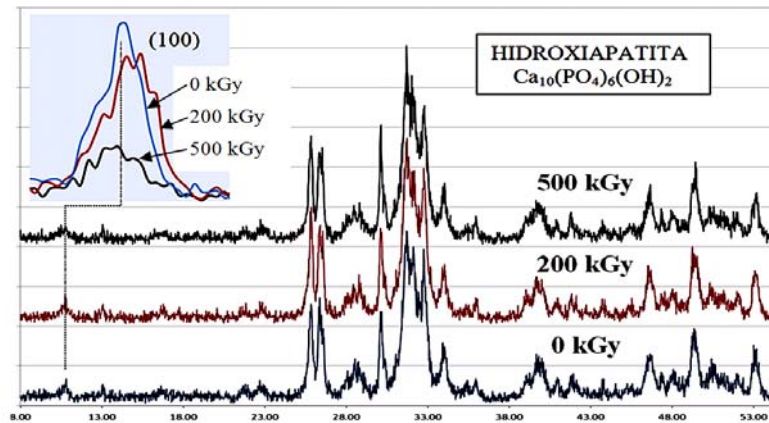


Figura 4. Patrones de difracción de rayos X de muestras de BHA gamma irradiadas a 0, 200 y 500 kGy.

3.6 Fluorescencia de rayos X

En la Tabla 2 se muestran la composición elemental determinada por FRX en las muestra de la BHA irradiada a 500 kGy.

Tabla 2. Elementos químicos determinados por FRX en BHA irradiada a 500 kGy.

Elemento	Concentración
Ca	36.00 %w
Fe	563 ppm
Br	11 ppm
Sr	46 ppm
P ₃ O ₁₃ H	63.9 %w
Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH	99.9 %w

Se puede apreciar en el espectro FRX de la Figura 5 y los datos de la Tabla 2, la presencia abundante de Ca y P correspondientes a la matriz de HA y la presencia escasa de Fe, Br y Sr, lo que ha permitido ajustar los espectros de DRX en los que se han encontrado tres fases adicionales a la HA, aunque en muy pocas cantidades y estas son: a) HA con sustitución de Sr, Ca_{8.98}Sr_{1.02}(PO₄)₆(OH)₂, b) Óxido de fosfato cálcico, Ca(PO₄)₆O y c) Óxido de fosfato de calcio y hierro, Ca_{28.8}Fe_{3.2}(PO₄)₂₁O_{0.5}.

Estudios anteriores han reportado la presencia de Sr como componente de una HA de origen bovino, lo cual corrobora el origen de la BHA estudiada en el presente artículo [17].

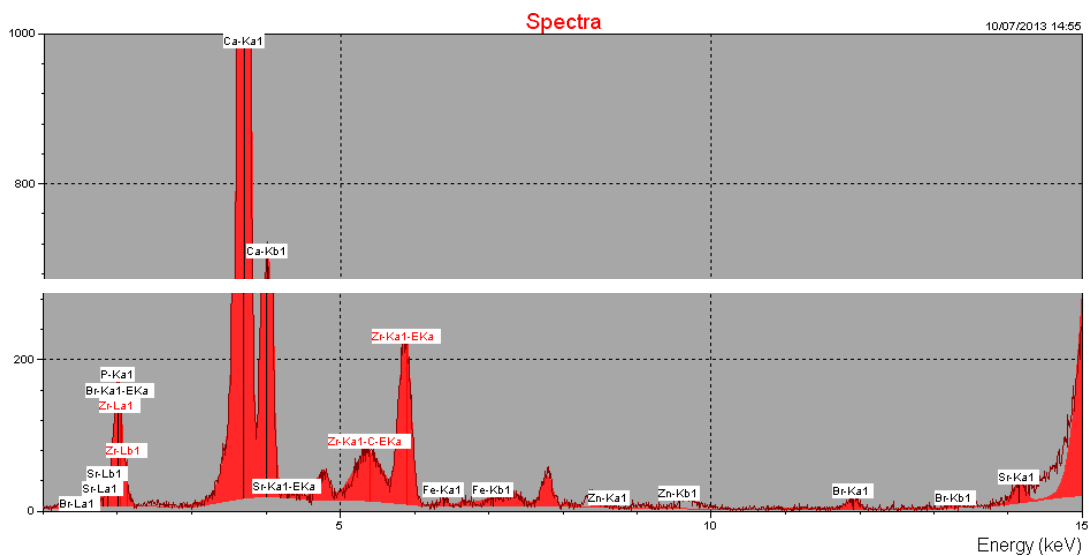


Figura 5. Espectro FRX de la BHA mostrando los picos elementales correspondientes.

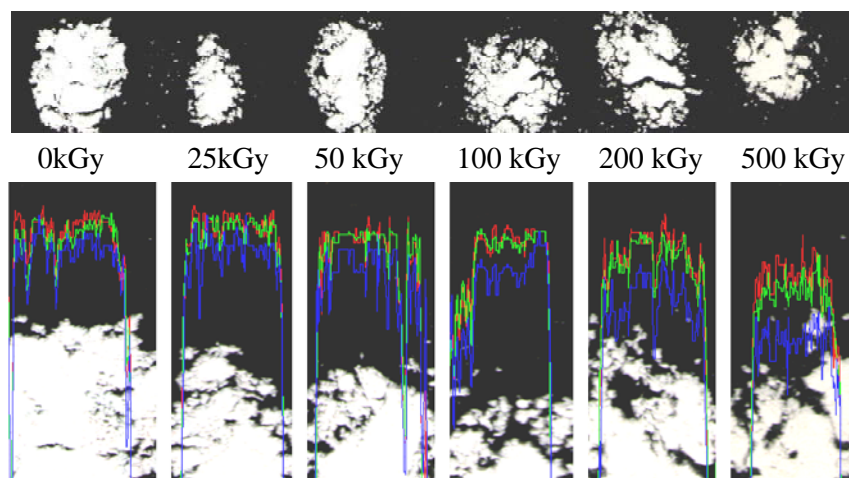


Fig. 6. Variación de componentes primarios de color de acuerdo con la dosis aplicada a la BHA.

3.7 Análisis de propiedades organolépticas

En la BHA irradiada se observa que el color se oscurece a medida que la dosis de irradiación aumenta. Debido a que estos cambios son de difícil percepción a simple vista, se escanearon las imágenes a 2400 dpi y se analizaron en sus componentes básicos de color con el software iTEM [14]. Los resultados se aprecian en la Figura 6, en cuya parte superior están ubicadas las imágenes de las muestras de BHA irradiadas a las dosis aplicadas y en la parte inferior se observa que las intensidades de los componentes cromáticos básicos, rojo, verde y azul, disminuyen a medida que se incrementa la dosis de 0 a 500 kGy. Esta variación se puede apreciar en la disminución de la intensidad del color azul.

También se ha examinado organolépticamente el olor y apariencia de todas las muestras irradiadas, desde 0 a 500 kGy. Los resultados de estas pruebas se pueden apreciar en la Tabla 3.

Se observa que el olor es característico sin variación sensible en todas las muestras. Visualmente, se observa que el color varía de blanco a crema oscuro y la apariencia se mantiene.

Tabla 3. Resultados del análisis de propiedades organolépticas.

Dosis (kGy)	Propiedad Física		
	Olor	Color	Apariencia
0	Característ.	Blanco	Gránulos
25	Característ.	Lig. crema	Gránulos
50	Característ.	Lig. crema	Gránulos
100	Característ.	Lig. crema	Gránulos
200	Característ.	Crema	Gránulos
500	Característ.	Crema oscuro	Gránulos

3.8 Análisis morfológico por microscopia electrónica de barrido

En la Figura 7 se observan las características morfológicas vistas con el Microscopio Electrónico de Barrido a 15000x para las muestras sin irradiar e irradiada a 200 y a 500 kGy.

No se observan cambios notorios a estas ampliaciones.

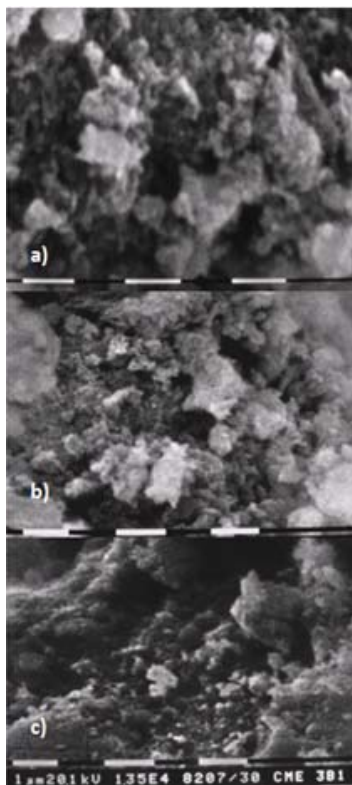


Figura 7. Micrografías MEB de la BHA a 0 kGy (a), 200 kGy (b) y 500 kGy (c).

4. Conclusiones

Las pruebas dosimétricas permitieron aplicar dosis de manera precisa y segura al producto con una relación entre dosis máxima y dosis mínima (uniformidad de dosis) de 1,66 kGy.

A una dosis de 25 kGy el producto ya se encuentra estéril.

A las dosis de irradiación aplicadas la disminución del contenido de humedad de las muestras no es significativa.

Por FTIR solo se encuentran cambios en el enlace C-O del CO_3^{2-} . Esta población de enlaces se incrementa a medida que aumenta la dosis hasta 500 kGy.

Por DRX se encuentra un ligero deterioro de la cristalinidad en la dirección cristalográfica (100) de la BHA.

Por FRX y DRX, adicionalmente a la presencia de BHA se han encontrado tres fases: 1. HA con sustitución de Sr, 2. Óxido de fosfato cálcico y 3. Óxido de fosfato de calcio y hierro.

Se ha confirmado el origen bovino de esta BHA estudiada.

No se observan cambios en el olor ni en la apariencia de las BHA irradiadas. El color experimenta un cambio de blanco a crema oscuro con el incremento de la dosis de irradiación, variación que se confirma con el análisis de los colores básicos. No se observan cambios notorios en la morfología a través del MEB.

La irradiación de la BHA hasta 500 kGy no produce cambios importantes en la estructura molecular ni en la estructura cristalina de la BHA, resultando la dosis de 25 kGy suficiente para aplicaciones biomédicas.

Desde el punto de vista de los biomateriales se observa que la BHA está compuesta de HA y otros componentes que dan lugar a HA, HA sustituidas, y otros componentes basados en óxidos fosfatados.

Los resultados obtenidos en esta investigación nos permiten conocer las propiedades físico-químicas y microbiológicas de una BHA adecuada, para su uso eficiente como matriz de soporte para la osteoconducción.

5. Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias de la UNI por facilitarnos el uso del Microscopio Electrónico de Barrido.

6. Bibliografía

- [1] Ruiz Marin, *et al.* Injertos sustitutos no óseos. Aportaciones del ácido poliláctico y poliglicólico. Av. Periodon. Implantol. 2009; 21(1):45-52.
- [2] Muñoz M, *et al.* Comparación entre distintos sustitutos óseos utilizados para procedimientos de elevación del seno maxilar previo a la colocación de implantes dentales. Avances en Periodoncia e Implantología. 2008; 20(3):155-164.
- [3] Agnieszka Sobczak *et al.* Acta of Bioengineering and biomechanics. 2009; 11(4):3-8.
- [4] Téllez Jiménez H, *et al.* Estudio de hidroxiapatita natural vs. Sintética en su aceptación biológica y eficacia regenerativa ósea en modelo animal. Oral Revista. 2009; 32:533-536.
- [5] Juan Carlos Quintana Díaz. Utilización de de la hidroxiapatita en cirugía máxilo-facial.

- Actualización bibliográfica. Revista Cubana Estomatología. 1998; 35(1):16-20.
- [6] Quintana Díaz J.C. Utilización de la Hidroxiapatita en Cirugía Májilo-facial. Actualización Bibliográfica. Revista Cubana Estomatología. 1998; 35(1):16-20.
- [7] Guzmán-García C, Manzo F. Efecto de la radiación gamma sobre los materiales compuestos de PEAD con hidroxiapatita. [Tesis para optar el título de Ingeniero Químico]. Universidad Central de Venezuela. 2003.
- [8] Yuichi Kawasaki, *et al.* Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2010; 9B(1):161-167.
- [9] American Society for Testing and Materials (ASTM). ASTM E 1026-04. Using the Fricke Reference Standard Dosimetry System.
- [10] American Society for Testing and Materials (ASTM). ASTM 51538:2002 (E). Standard practice for use of the ethanol-chlorobenzene dosimetry system.
- [11] United States Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopoeia 35 <61>, 2012.
- [12] Olivera P, Greewich R. Análisis bioarqueométrico de los restos óseos de Francisco Pizarro. En: Instituto Peruano de Energía Nuclear. Informe Científico Tecnológico 2010. Lima: IPEN. 2011. p. 3-7.
- [13] Montalvo Balarezo OA, Olivera de Lescano O, Rivera Castilla D. Análisis multielemental de restos óseos por fluorescencia de rayos X para la reconstrucción de dietas del periodo temprano en la cultura Lima. Boletín de la Sociedad Química del Perú. 1998; 64(2): 133-144.
- [14] Olympus Soft Imaging Solutions. iTEM Family. [homepage de Internet]. Disponible en: http://www.soft-imaging.net/en/eu/eng/2343_5832.htm
- [15] Fang Yao, John P LeGeros, Racquel Z LeGeros Acta Biomaterialia Volume 5, Issue 6, July 2009, Pages 2169–2177
- [16] Jiangling Li. Structural characterization of apatite-like materials. [Thesis]. College of Engineering and Physical Sciences, University of Birmingham, UK, 2009, 21.
- [17] Bahrololoom ME, *et al.* Journal of Ceramic Processing Research. 2009; 10(2):129-138.