

ESTUDIO DE INFILTRACIÓN DE GELATINA TIPO A EN PIEZAS DE TITANIO POROSO

H. Mehdi-Sefiani^{1,2}, V.M. Perez-Puyana², E. Chicardi¹

¹Departamento de Ingeniería y Ciencia de los Materiales y del Transporte, Universidad de Sevilla.

²Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad de Sevilla.

hanmehsef@gmail.com

Resumen: Con el avance de la medicina, la esperanza de vida cada vez es mayor. Desafortunadamente, esto conlleva al incremento de la incidencia de enfermedades degenerativas como son las enfermedades óseas. Ante ello, este estudio, basado en la infiltración y liberación de hidrogel del 3% de gelatina tipo A en piezas porosas de Ti con una porosidad nominal del 30 y 60 %, surge con el fin de evaluar la capacidad del proceso para actuar como una forma potencial novedosa, alternativa y localizada de introducir sustancias farmacéuticas activas, como antibióticos, medicamentos o antiinflamatorios no esteroideos. Con ello no solo se logrará combatir posibles infecciones e inflamaciones postoperatorias sino que también se podría mejorar la biocompatibilidad y osteointegración del Ti.

Palabras clave: gelatina, hidrogel, titanio, infiltración, liberación, osteointegración, biocompatibilidad.

1. INTRODUCCIÓN.

Con el aumento de la esperanza de vida es previsible que cada vez más personas se vean afectadas por enfermedades degenerativas como son las enfermedades óseas, aquellas que requieren de tratamientos que involucran el uso de células, factores de crecimiento y sustitutos óseos, como biomateriales / andamios, con propiedades biocompatibles, osteoinductivas y osteoconductoras [1].

Ante ello se han intensificado las investigaciones con el fin de lograr alcanzar implantes ideales y personalizados que puedan poner fin a las dificultades que presentan los pacientes con enfermedades óseas.

En particular, los materiales metálicos han sido, desde sus inicios hasta la actualidad, los materiales más empleados para fabricar implantes óseos [2]. Su presencia en estas aplicaciones médicas se caracteriza por su resistencia para soportar cargas mecánicas y a fatiga.

Ahora bien, materiales metálicos como es el titanio (Ti), presentan un módulo elástico mayor que el del hueso, lo que puede ocasionar el fenómeno de *stress shielding*. Para hacer frente a ello, actualmente se realizan numerosas modificaciones superficiales como es la incorporación de porosidad interconectada que conlleva tanto a mejorar la similitud de módulos de elasticidad entre el implante metálico y el hueso, como a facilitar la distribución y migración celular. Además, para conseguir los objetivos de la implantación como es el hecho de conseguir una correcta osteointegración del implante, en la actualidad, desde el punto de vista de los materiales, la tendencia es obtener sistemas inteligentes, cargados con el principio activo del medicamento, que respondan a estímulos del ambiente y puedan liberar su carga en el lugar, el tiempo y a la velocidad deseada [3].

Con el fin de mejorar las propiedades del Ti mediante el uso de sistemas de liberación controlada nace el siguiente estudio. Este trabajo ha consistido en elaborar piezas de Ti con una porosidad nominal del 30 y 60 % mediante la técnica de *Space Holder*. Además, para mejorar tanto la biocompatibilidad como la osteointegración del Ti se ha llevado a cabo la infiltración y liberación de un polímero biodegradable y biocompatible denominado hidrogel cuya capacidad de absorción ha permitido su uso como sistemas de liberación controlada de sustancias activas que podrían ser, por ejemplo, fármacos que estimulen el crecimiento óseo alrededor del implante acelerando así la osteointegración.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

2.1 Síntesis y caracterización del hidrogel.

Para la síntesis de los 3 sistemas de hidrogeles se hizo uso de gelatina tipo A como materia prima y ácido acético 0,05 M como disolvente. La formación de hidrogeles a base de gelatina se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo previamente definido por Pérez-Puyana y colaboradores. [4]. Brevemente, se prepararon soluciones poliméricas al 1, 2 y 3% en peso (denominadas 1, 2 y 3%, respectivamente) y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos, manteniendo la temperatura de la solución a 4°C. Luego, se realizó el proceso de gelificación manteniendo las soluciones en un frigorífico a 4°C durante 2h.

Posteriormente, se realizó la caracterización reológica de los hidrogeles para evaluar sus propiedades físicas y mecánicas. Se realizaron pruebas de barrido de deformación para evaluar el rango viscoelástico lineal (LVR) y la deformación crítica (última deformación en la región viscoelástica lineal). Estos ensayos se realizaron entre 0,001 y 40,0 % de deformación a una

frecuencia constante de 1 Hz y 20 °C. Seguidamente, se realizaron pruebas de barrido de frecuencia entre 0,02 y 20 Hz a tensión constante (dentro del LVR de cada sistema). Con ello se analizaron el módulo elástico y viscoso (G' y G'' respectivamente) y la tangente de pérdidas ($\tan \delta = G''/G'$) a 1 Hz para mejorar la comparación entre los sistemas (G'_1 y $\tan \delta_1$, respectivamente). Además, también se realizaron curvas de flujo entre 0,1 y 400 s^{-1} para evaluar la evolución de la viscosidad con respecto a la velocidad de cizalla. Se seleccionaron valores de viscosidad a 100 s^{-1} ($\eta \cdot 100$) para comparar los sistemas.

El análisis morfológico fue realizado con un microscopio electrónico de barrido criogénico (Cryo-SEM) con el fin de observar el hidrogel (semilíquido) en su estado natural, evitando así encogimientos, distorsiones y el uso de los agentes tóxicos requeridos para la fijación de materiales biológicos.

El análisis de la degradación de los hidrogeles se realizó siguiendo un protocolo previamente descrito por Essawy y colaboradores. [5]. En resumen, se prepararon hidrogeles con un 5% en peso de sulfato de zinc respecto a la concentración de proteína utilizada en su formulación inicial. Una vez formados, se sumergen en agua MiliQ, y se mide la conductividad de la solución con respecto al tiempo con un conductímetro. La degradación de los hidrogeles se relaciona con la liberación de sulfato de zinc al medio y el posterior aumento de la conductividad hasta alcanzar un valor constante. El comportamiento de degradación de los hidrogeles se modeló siguiendo la ecuación definida por Korsmeyer y colaboradores. [6] para sistemas poliméricos (Ec. 1):

$$L = k \cdot t^n \quad (1)$$

donde L es la degradación del sistema y t es el tiempo transcurrido. Los parámetros obtenidos de esta ecuación permitieron conocer el mecanismo de degradación que estaba teniendo lugar (n), así como su cinética (k).

2.2 Fabricación y caracterización de las piezas de titanio.

En el presente estudio se elaboraron piezas de titanio con una porosidad nominal del 30 y 60 % en volumen (nombrados como Ti30 y Ti60, respectivamente) mediante la técnica de espaciadores. La fabricación de los andamios con este método consiste en añadir partículas temporales, al polvo de matriz metálica. Las partículas temporales servirán como partículas de retención de espacio actuando así como formadores de poros donde se llevará a cabo la infiltración y liberación de los hidrogeles elaborados previamente [7]. En este caso se hizo uso de Ti comercialmente puro como polvo metálico y cloruro sódico como partículas espaciadoras. El Ti c.p. y las partículas NaCl se homogeneizaron en un agitador TURBULA® 3D a una frecuencia de 96 $\text{ciclos} \cdot \text{min}^{-1}$ durante 40 min. Posteriormente, la mezcla obtenida se compactó mediante prensado uniaxial en una máquina de ensayo universal a 400 MPa. Los

cilindros compactados obtenidos se sumergieron en agua destilada caliente (1L, 60°C) y se agitaron a 100 rpm para promover la disolución del NaCl. Éstas fueron sinterizadas en un horno tubular a 1200°C por 2h, 10°C·m⁻¹ de velocidad de calentamiento, enfriamiento libre y bajo atmósfera de alto vacío (10⁻⁴ mbar).

Las piezas sinterizadas fueron detalladamente caracterizadas. En primer lugar, se determinó la densidad absoluta de las muestras mediante geometría con el objetivo de conocer el porcentaje de porosidad total. A continuación, se calcularon la densidad, porosidad total, abierta y cerrada siguiendo el método de Arquímedes para materiales metálicos porosos (ASTM C373-88).

Para determinar la morfología y la distribución del tamaño de los poros, se llevó a cabo un análisis de imágenes en piezas Ti30 y Ti60 empleando un microscopio óptico Nikon Eclipse MA100N.

2.3 Infiltración-degradación de los hidrogeles en los poros de las piezas Ti30 y Ti60.

Se usaron las piezas Ti30 y Ti60 para infiltrar y posteriormente degradar y liberar el hidrogel desde ambas muestras. Para el proceso de infiltración, las piezas Ti30 y Ti60 se sumergieron en el hidrogel a temperatura ambiente y se determinó la ganancia de peso (asociada a la infiltración del hidrogel por capilaridad) con respecto al tiempo de inmersión. Los procesos de infiltración se detuvieron cuando la porosidad abierta total fue rellenada por el hidrogel y/o se alcanzó un estado estacionario. Este proceso se replicó con el hidrogel cargado de sulfato de zinc para que se pudiera seguir la evaluación del hidrogel (asociada a la liberación de ZnSO₄) infiltrado en los poros de Ti siguiendo el protocolo de determinación de conductividad previamente descrito por Essawy y colaboradores. [5].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Síntesis y caracterización del hidrogel.

La caracterización reológica se inició con las pruebas de barrido de deformación. De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 1), podemos destacar que el hidrogel con menor concentración presenta una menor resistencia a la deformación. Además, se observa que el máximo de deformación crítica se encuentra para el sistema elaborado al 2%, aunque sin diferencias significativas con el sistema elaborado a mayor concentración.

Una vez conocido el rango viscoelástico lineal, se realizaron ensayos de barrido de frecuencia cuyos resultados se observan en la Figura 1.

Tabla 1. Deformación crítica de los hidrogeles en función de la concentración de gelatina (1, 2 y 3% en peso).

Sistemas	Deformación crítica (%)	G' (Pa)	tan δ ₁	η* ₁₀₀ (Pa·s)
Hidrogel 1%	0.5 ± 0.2	17.9 ± 4.1	0.26 ± 0.03	0.06 ± 0.05
Hidrogel 2%	20.6 ± 6.6	18.3 ± 3.7	0.19 ± 0.02	0.63 ± 0.04
Hidrogel 3%	14.8 ± 0.3	1983. ± 75.5	0.04 ± 0.01	3.69 ± 0.21

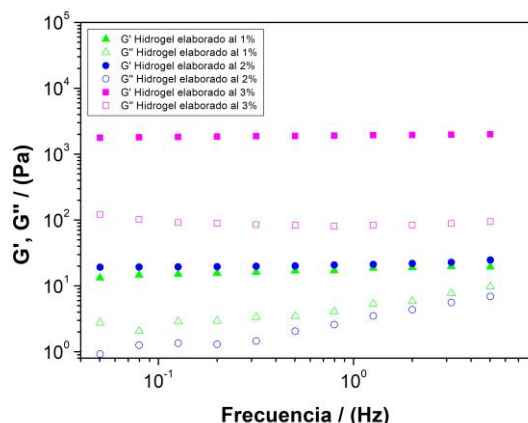


Figura 1. Módulo elástico y viscoso obtenidos a partir de los ensayos de barrido de frecuencia.

De acuerdo con los perfiles obtenidos para los tres sistemas, los valores de G' son siempre mayores que los de G'', mostrando así un comportamiento predominantemente elástico. Además, los tres sistemas mostraron un perfil constante en el rango de frecuencias estudiado corroborando su estabilidad. Por otro lado, comparando el módulo de elasticidad y la tangente de pérdidas (G''/G') a 1 Hz incluidos en la *Tabla 1*, se puede anotar que el sistema con mayor G' es aquel sistema con mayor concentración de cadenas proteicas y por tanto aquel más estable debido a una mayor interacción y estructuración destacando el hidrogel al 3%. Por otro lado, los resultados obtenidos al realizar las curvas de flujo indican que todos los sistemas presentaron un comportamiento pseudoplástico ya que la viscosidad disminuye a medida que aumenta la velocidad de corte, lo que hace que los hidrogeles sean más fluidos (*Figura 2*).

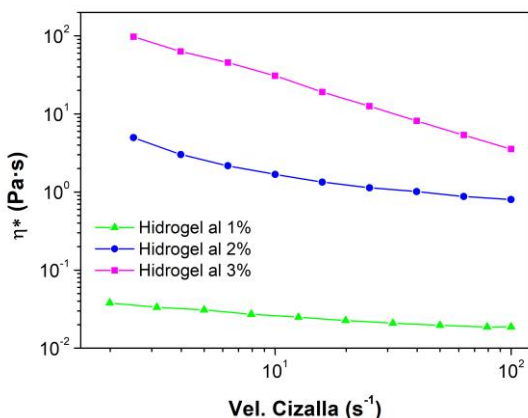


Figura 2. Evolución de la viscosidad de cada sistema conforme aumenta la velocidad.

Partiendo de los resultados mostrados previamente se puede concluir que los sistemas del 2 y 3 % en peso son aquellos que presentan una mayor estabilidad y, por tanto, son los que más se ajustan al objetivo de ser utilizados como sistemas de liberación controlada. Ante ello se descartó el hidrogel del 1 % para la evaluación microestructural. La *Figura 3* muestra las microestructuras del hidrogel al 2 y 3% a 2000x y 4000x comprobando que la estructura del hidrogel del 3% presenta un mayor tamaño de poro.

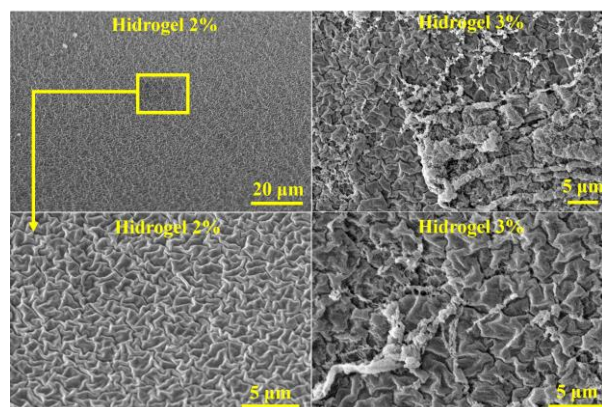


Figura 3. Imágenes obtenidas por Cryo-SEM para hidrogeles al 2% (arriba) y al 3% (abajo).

Con respecto al análisis de degradación, los resultados obtenidos mostraron que aquellos hidrogeles con mayor concentración de proteína presentaban una liberación lenta y, por tanto, requerían de un mayor tiempo para degradarse por completo.

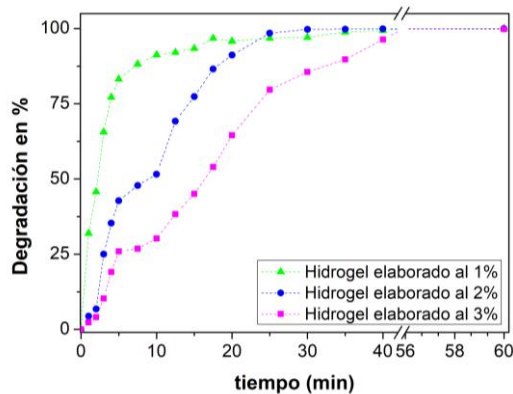


Figura 4. Perfiles de degradación de los diferentes hidrogeles en función del tiempo.

A continuación, los distintos perfiles fueron modelizados mediante la ecuación de Kosmeyer and Pepper cuyos resultados se observan en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Valores de la constante cinética (k) y mecanismo de degradación (n) obtenidos para los hidrogeles (1, 2 y 3%).

Sistemas	k (min ⁻ⁿ)	n
Hidrogel 1%	51.9	0.19
Hidrogel 2%	17.3	0.51
Hidrogel 3%	8.6	0.64

El hidrogel al 1% tuvo una mayor constante cinética (k) que el hidrogel al 3%, por lo que el hidrogel preparado con menor concentración de proteína presentó una liberación más rápida, corroborando lo afirmado en la *Figura 4*. Además, según los valores de n definidos por Korsmeyer et al. [8], los hidrogeles al 1% no tuvieron un mecanismo de liberación específico, los hidrogeles al 2% presentaron liberación por difusión y la degradación del sistema al 3% se debió principalmente a la relajación de las cadenas proteicas.

3.2 Fabricación y caracterización de las piezas de titanio.

La caracterización de las muestras de Ti comenzó con la obtención del porcentaje de porosidad total promedio relacionado con el porcentaje de densificación obtenido por geometría (*Tabla 3*). A continuación, se determinó el porcentaje de porosidad total, abierta y cerrada promedio mediante el método de Arquímedes (*Tabla 3*).

Tabla 3. Porosidad total por geometría, Porosidad total, abierta y cerrada por Arquímedes.

Muestra	Ti 30	Ti 60
% Porosidad total por geometría	40,9 ± 4,9	63,2 ± 0,3
% Porosidad total por Arquímedes	39 ± 4,7	60,4 ± 0,1
% Porosidad abierta	34,3 ± 7,1	43,8 ± 6,3
% Porosidad cerrada	4,7 ± 2,5	16,6 ± 6,3

Se puede observar en la *Tabla 3* cómo la porosidad total, obtenida por ambos métodos, es ligeramente superior a la nominal debido a la microporosidad inherente a la sinterización. Ahora bien, el aspecto más importante para este estudio es la presencia de porosidad interconectada, útil para la posterior infiltración y liberación del hidrogel.

Por otro lado, tras la preparación metalográfica de las muestras, se obtuvieron micrografías ópticas de las secciones transversales pulidas de las que podemos destacar una porosidad homogénea en ambas muestras, aunque la muestra Ti60 presenta un mayor porcentaje de porosidad interconectada.

3.3 Infiltración-degradación de los hidrogeles en los poros de las piezas Ti30 y Ti60.

Una vez caracterizados los hidrogeles se seleccionó aquel que presenta un 3 % de gelatina como el hidrogel óptimo para ser infiltrado en el interior de los poros de las piezas de titanio y posteriormente liberado actuando así como un sistema para liberación controlada de fármacos. En particular, su elección se debía a que presentaba un mayor carácter sólido y mayor tamaño de poro.

Los resultados obtenidos en el proceso de infiltración nos informaron que la infiltración era generalmente mayor en la muestra Ti60 debido a la mayor presencia de porosidad en Ti60 con respecto a Ti30. Además, en

Ti60 se alcanza un valor constante que puede deberse a una saturación de los poros.

Con respecto al proceso de degradación, la liberación del sulfato de zinc es más rápida en la muestra de Ti30 que en la muestra de Ti60. Con este resultado se puede resaltar la porosidad interconectada presente en la muestra Ti60. Al ser esta superior que en el caso del Ti30 implica que la sustancia se encuentra en el interior del titanio por lo que tarda más en salir al medio.

4. CONCLUSIONES.

En el presente trabajo, se ha logrado infiltrar y liberar un hidrogel al 3 % de gelatina tipo A en piezas de titanio con un 30 y 60 % de porosidad nominal. Esta nueva línea de investigación está presentando buenos resultados iniciales, aunque todavía se debe optimizar tanto el proceso de infiltración como de liberación. Esto se debe a que los resultados obtenidos en la infiltración no permiten conocer si se ha producido el 100 % de saturación del hidrogel en los poros mientras que el proceso de liberación tampoco corrobora la degradación completa del hidrogel y por tanto liberación de toda la sustancia que presenta en su interior.

5. REFERENCIAS.

- [1] M. R. Iaquinta *et al.*, "Innovative biomaterials for bone regrowth," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 3. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Feb. 01, 2019.
- [2] G. M. De Peppo *et al.*, "Free-form-fabricated commercially pure Ti and Ti6Al4V porous scaffolds support the growth of human embryonic stem cell-derived mesodermal progenitors," *ScientificWorldJournal*, vol. 2012, p. 14, 2012.
- [3] A. Arredondo-Peñaranda and M. E. Londoño-López, "Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos," *Rev. Ing. Biomédica*, vol. 3, pp. 83–94, 2014.
- [4] V. Perez-Puyana, M. Jiménez-Rosado, A. Romero, and A. Guerrero, "Fabrication and characterization of hydrogels based on gelatinised collagen with potential application in tissue engineering," *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 5, p. 1146, May 2020.
- [5] H. A. Essawy, M. B. M. Ghazy, F. A. El-Hai, and M. F. Mohamed, "Superabsorbent hydrogels via graft polymerization of acrylic acid from chitosan-cellulose hybrid and their potential in controlled release of soil nutrients," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 89, pp. 144–151.
- [6] R. W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, and N. A. Peppas, "Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers," *Int. J. Pharm.*, vol. 15, no. 1, pp. 25–35, May 1983.
- [7] E. Rupérez, J. M. Manero, K. Riccardi, Y. Li, C. Aparicio, and F. J. Gil, "Development of tantalum scaffold for orthopedic applications produced by space-holder method," *Mater. Des.*, vol. 83, pp. 112–119, Oct. 2015.