

Conversión hidrotermal de calcita de cáscara de huevo en micro-nanopartículas de fosfato de calcio para aplicaciones biomédicas

Adriana Torres-Mansilla (1), Pedro Álvarez-Lloret (1*), Annarita D'Urso (2), Francesca Oltolina (2), Antonia Follenzi (2), Jaime Gómez-Morales (3*)

(1) Departamento de Geología. Universidad de Oviedo, 33005, Oviedo (España)

(2) Dipartimento di Scienze della Salute. Università del Piemonte Orientale, 28100, Novara (Italia)

(3) Laboratorio de Estudios Cristalográficos. IACT-CSIC-Universidad de Granada, 18100, Armilla (España)

Palabras Clave: Apatito, Cáscara de huevo, Material Biomimético. **Key Words:** Apatite, Eggshell, Biomimetic Material.

* corresponding authors: pedroalvarez@uniovi.es; jaime@lec.csic.es

INTRODUCCIÓN

La cáscara de huevo es un biomaterial que cuenta con propiedades cristalinas y composicionales únicas para su uso en reacciones de reemplazo mineral. Este material contiene aproximadamente 96% de CaCO_3 en forma de calcita, y un porcentaje restante que incluye un 2% de matriz orgánica y otros elementos minoritarios (Hincke et al., 2011). La ultraestructura de la cáscara está constituida por cristales columnares íntimamente asociados con la matriz orgánica. Esta matriz está compuesta por una mezcla de proteínas (p.ej. ovocleidinas y ovocalixinas, entre otras muchas) y glicosaminoglicanos (p.ej. ácido urónico, galactosaminoglicano y ácido hialurónico) (Nys et al., 2004.). La matriz orgánica es fundamental en el proceso de calcificación y construcción de la cáscara, el cual da lugar a un material altamente estructurado y con una elevada porosidad intrínseca.

La cáscara de huevo constituye una abundante fuente de carbonato de origen natural, no obstante, este material está infrautilizado y en su mayoría, se desecha en ciclos de procesamiento alimentario. Según estimaciones (Waheed et al., 2020) la cantidad de cáscara desechada durante el año 2018 fue cercana a los 8.5 millones de toneladas, siendo la decimoquinta fuente de contaminación de la industria de la alimentación. Por esta razón, la reutilización de este subproducto permitiría reducir el coste económico y ambiental causado por el mismo durante su procesamiento. Una forma sencilla de reutilizarlo es a través de la modificación de su composición química y estructural a través de diferentes métodos de reacción y modificación controlada para diversas aplicaciones industriales y/o tecnológicas.

El método hidrotermal es un proceso de modificación composicional que permite obtener materiales altamente cristalinos en condiciones de reacción relativamente moderadas, en donde se pueden controlar con facilidad parámetros como el tiempo de reacción y la temperatura (Qiu & Jia, 2021). A través de esta vía se han podido transformar diferentes tipos de carbonato de calcio en fosfato de calcio (apatito) para objetivos de interés biomédico (Verwilghen et al., 2009). Los fosfatos de calcio son minerales de interés en el desarrollo de materiales en ciencias de la salud gracias a su similitud composicional, fisicoquímica y estructural con la fase mineral de huesos y dientes. Sin embargo, existe información limitada acerca del efecto de la matriz orgánica de la cáscara de huevo durante su transformación a fosfatos de calcio. En consecuencia, la presente investigación tiene como objetivo estudiar en detalle la transformación hidrotermal de la cáscara en sales de fosfato cálcico, observando el efecto de la matriz orgánica en este proceso. Además, se pretende estudiar las propiedades biológicas de la cáscara transformada en fosfato cálcico para determinar su potencial de uso clínico. De esta manera, se busca contribuir con el reaprovechamiento de la cáscara de huevo y estudiar factores que permitan un reemplazamiento controlado y estructurado de este carbonato cálcico biogénico en partículas de interés biomédico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se recogieron cáscaras de huevo y se dividieron en dos grupos: cáscaras de huevo sin tratamiento y cáscaras de huevo tratadas con hipoclorito de sodio (NaClO), para la eliminación selectiva de la componente orgánica del material. Posteriormente, las cáscaras de ambos grupos se trituraron y tamizaron en diferentes rangos

de tamaño de partícula: 50, 100 y 200 μm . El carbonato de calcio particulado se colocó en tubos de presión y reactores hidrotermales donde se agregó una solución de fosfato dipotásico (K_2HPO_4), en proporción Ca/P 1.67. A continuación, se llevó a cabo el tratamiento hidrotermal a temperaturas entre 100°C y 200°C durante 7 días. La caracterización fisicoquímica se realizó mediante microscopía electrónica de barrido, análisis espectroscópicos (FTIR-ATR y Raman) y difracción de rayos X (Figura 1). Seguidamente, se realizaron pruebas biológicas de las partículas de cáscara de huevo antes y después del tratamiento hidrotermal, evaluando la citocompatibilidad con células tumorales de osteosarcoma humano MG-63 y células madre mesenquimales murinas m17.ASC. También se evaluó la diferenciación osteogénica de las células m17.ASC y se cuantificó mediante las técnicas de tinción histoquímica con fosfatasa alcalina (ALP) y rojo S de alizarina (Tietz et al., 1999).



Figura 1. Resumen gráfico de la transformación hidrotermal con cáscara de huevo. El recuadro muestra resultados de difracción de rayos X donde evidencia la transformación de calcita a apatito.

RESULTADOS

Las partículas obtenidas tras el tratamiento hidrotermal presentaron características morfológicas, y composicionales compatibles con sales de fosfato cálcico. Esta conversión sucedió de manera diferente para las partículas en las cuales se conservó la matriz orgánica, presentando un depósito mineral mixto, con cristales hexagonales y nanoestructurados. En las partículas de cáscara de huevo tratadas con NaClO , la textura del depósito permaneció nanogranulada, similar a la textura inicial de las mismas. Los métodos espectroscópicos y de difracción de rayos X permitieron evidenciar la transformación química a fosfatos de calcio en diferentes grados de conversión controlada. Las partículas de carbonato cálcico biogénico y las de fosfatos cálcicos de ambos grupos (cáscara sin tratamiento y cáscara con NaClO) presentaron compatibilidad con las células MG-63 y m17.ASC, promoviendo también la diferenciación osteogénica de m17.ASC.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El método hidrotermal permite transformar la cáscara de huevo en fases de fosfato de calcio. Dentro de este proceso, la preservación de la matriz orgánica influye sobre las características de las partículas transformadas, en particular, a nivel morfológico. Este efecto de la matriz orgánica podría utilizarse en la síntesis de biomateriales microestructurados de fosfato de calcio. Adicionalmente, las partículas obtenidas presentan excelentes propiedades biológicas. De esta manera se contribuye al desarrollo sostenible de industrias intensivas en el uso del huevo, transformando las cáscaras en materiales con aplicaciones clínicas en medicina y odontología.

Agradecimientos: Subvención ref. PCI2020-112108 financiada por MCIN/AEI/10.13039-/501100011033 (España) del proyecto CASEAWA - ERA-NET Cofund BlueBio H2020 y "NextGenerationEU".

REFERENCIAS

- Hincke, M., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., Rodríguez-Navarro, A., McKee, M. (2011): The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front Biosci.*, **17** (4), 1266-80. DOI: 10.2741/3985.
- Nys, Y., Gautron, J., García-Ruiz, J., Hincke, M. (2004) : Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *Comptes Rendus Palevol.*, **3** (6-7), 549-562. DOI: 10.1015/j.crpv.2004.08.002.
- Tietz, N.W., Burtis, C.A., Ashwood, E.R. and Saunders, W.B. (1999): *Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd Edition, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 676-684.
- Qiu, J. & Jia, Y. (2021): -2 Synthesis Methods. In "In Woodhead Publishing Series in Electronic and Optical Materials, Persistent Phosphors", Woodhead Publishing. Sawston, Cambridge, 31-67.
- Verwilghen, C., Chkir, M., Rio, S., Nzihou, A., Sharrock P., Depelsenaire, G. (2009): Convenient conversion of calcium carbonate to hydroxyapatite at ambient pressure. *Mater. Sci. Eng. C.*, **29** (3), 771-773.
- Waheed, M., Yousaf, M., Shehzad, A., Inam-Ur-Raheem, M., Khan, M., Khan, M., Ahmad, N., Aadil, A. (2020): Channelling eggshell waste to valuable and utilizable products: A comprehensive review. *Trends Food Sci Technol.*, **106**, 78-90. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.10.009.