

## OBTENCIÓN DE HIDROXIAPATITA NANOMÉTRICA PARA APLICACIONES MÉDICAS

URSULA SPADAVECCHIA<sup>1</sup>, GEMA GONZÁLEZ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ingeniería-Escuela de Metalurgia,  
Apartado Postal 51717 - Caracas 1050, e-mail: ursula\_spadavecchia@yahoo.com

<sup>2</sup> Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Carretera Panamericana, Km 11, Altos de Pipe,  
Apartado 21827 – Caracas 1020-A, e-mail: gemagonz@ivic.ve

Recibido: julio de 2006

Recibido en forma final revisado: octubre de 2007

### RESUMEN

En este estudio se emplearon dos métodos de síntesis para la obtención de Hidroxiapatita (HA). Las síntesis se llevaron a cabo mezclando sales de calcio y fósforo a 25 °C. La suspensión obtenida se envejeció, sin agitación, por tiempos entre 3 y 21 días a 25 °C, y a temperaturas de 90, 125 y 150 °C por 3 días, con el fin de estudiar la influencia del tiempo y la temperatura en la cristalización del material. Los productos se caracterizaron por Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopía de Infrarrojo (IR), Microscopía Electrónica de Transmisión y Barrido (MET y MEB) y Espectroscopia de Emisión Atómica por inducción de plasma acoplado (ICP-AES, por sus siglas en inglés: Inductive Coupled Plasma–Atomic Emission Spectrometry), para el análisis químico. Por ambos métodos se obtuvo Hidroxiapatita (HA) cristalina con tamaños de partículas inferiores a 100 nm y una relación Ca/P entre 1,50 y 1,75. Estos resultados dan a los materiales obtenidos buenas características para ser empleados en aplicaciones médicas.

*Palabras clave:* Hidroxiapatita, Síntesis, Caracterización, Nanopartículas, Biomaterial.

## NANOMETRIC HYDROXYAPATITE SYNTHESIS FOR MEDICAL APPLICATIONS

### ABSTRACT

Two methods were employed in this study in order to obtain Hydroxyapatite (HA). The processes were carried out mixing salts of calcium and phosphor. The suspension was aged, without agitation, from 3 to 21 days at 25 °C and they were aged at 90, 125 and 150 °C for 3 days, in order to study the influence of time and temperature in the material's crystallization. The products were characterized by X-Ray Diffraction (XRD), Infrared Spectroscopy (IR), Transmission and Scanning Electron Microscopy (TEM and SEM), and Inductive Coupled Plasma–Atomic Emission Spectrometry (ICP–AES) for chemical analysis. From both methods crystalline HA was obtained, with particle sizes under 100 nm and a Ca/P ratio in the range of 1.50 and 1.75. These results give the obtained materials good characteristics for medical applications.

*Keywords:* Hydroxyapatite, Synthesis, Characterization, Nanoparticles, Biomaterial.

### INTRODUCCIÓN

La Hidroxiapatita (HA) es un fosfato cálcico de fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , cuya composición fisicoquímica es similar a los constituyentes minerales del hueso humano (Lu, 1999). El estudio de sus propiedades ha sido de gran relevancia en los últimos años, por su potencial aplicación médica para trasplantes óseos y dentales. Varios factores afectan el desempeño del material para este tipo de aplicaciones, entre ellos la composición química, la

porosidad y el tamaño de los poros, (Lu, 1999). Entre las ventajas de emplear HA se tiene que no es tóxica y es compatible química y biológicamente con el hueso humano y el ambiente fisiológico, por lo que no es rechazada por el organismo (Cao, 1996) y tiene la capacidad de enlazarse morfológicamente con el hueso (Cao, 1996). En presencia de una estructura porosa apropiada presenta un excelente potencial para el crecimiento del hueso en su superficie y dentro de los poros, lo que se conoce como osteoconductividad (Ito, 1990; Willman, 1996; Specchia,

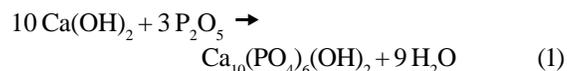
2002; Cao, 1996). Entre las aplicaciones de la HA se encuentra el relleno de defectos en huesos, el implante de piezas compactas densas y porosas, el empleo como cemento, entre otras (Narasaraju, 1996; Hench, 1998; Fernández, 1999; Milosevski, 1999; Kokubo, 2000; Wang, 2000).

Se considera a la HA como un material bioactivo, ya que promueve una respuesta biológica específica en la interfaz del material, la cual resulta en la formación de un enlace entre los tejidos y el material (Hench, 1998). Los materiales bioactivos se enlazan al hueso sin producir tejido fibroso en las intercaras material–tejido óseo, además estos materiales promueven el crecimiento del mineral óseo (Hulbert, 1990), también conocido como osteointegración (Williams, 1987). Algunas características importantes que deben ser consideradas en materiales para implantes son el tamaño de partícula, la estequiometría, la morfología y la cristalinidad, ya que estos factores afectan las propiedades fisicoquímicas de la HA y, por lo tanto, la respuesta en el medio fisiológico del cuerpo humano (Ito, 1990; Milosevski, 1997; Yuan, 1998; Oonishi, 1999; Lu, 1999). El objetivo de este trabajo es presentar un estudio comparativo de dos métodos de síntesis de HA para su uso en aplicaciones médicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Síntesis por el método 1

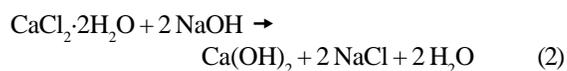
Se preparó HA siguiendo la reacción:



Donde una solución de  $\text{P}_2\text{O}_5$  se goteó en una suspensión de  $\text{Ca(OH)}_2$ , empleando agua desionizada. La mezcla se llevó a cabo bajo fuerte agitación y se añadió  $\text{NH}_4\text{OH}$  en solución acuosa 1:1 para mantener el pH sobre 10, ya que en este tipo de mezclas es imprescindible mantener el pH sobre 9 para favorecer la precipitación de HA en vez de otros fosfatos cálcicos como el fosfato tricálcico o el fosfato octacálcico, entre otros (Fernández, 1999).

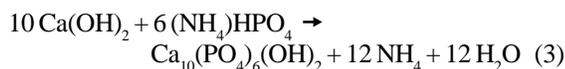
### Síntesis por el método 2

Para el método 2 se preparó un gel de  $\text{Ca(OH)}_2$  a partir de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{NaOH}$ , siguiendo la reacción:



El gel de  $\text{Ca(OH)}_2$  se lavó cuidadosamente varias veces para eliminar los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  remanentes. El siguiente paso fue la formación de la suspensión de  $\text{Ca(OH)}_2$  con agua desionizada, bajo fuerte agitación. Simultáneamente se preparó una solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  en agua desionizada,

que se agregó a la suspensión de  $\text{Ca(OH)}_2$  bajo fuerte agitación, siguiendo la reacción:



Para ambos métodos se estudió la influencia del tiempo y la temperatura de envejecimiento. Los productos se envejecieron a 25 °C por períodos de tiempo de 0 a 21 días, y a temperaturas de 90°, 125° y 150 °C por 3 días, respectivamente. El material extraído de cada proceso se lavó hasta alcanzar un pH neutro y se secó a 60 °C. Los materiales obtenidos se molieron en un mortero de ágata para separar los aglomerados.

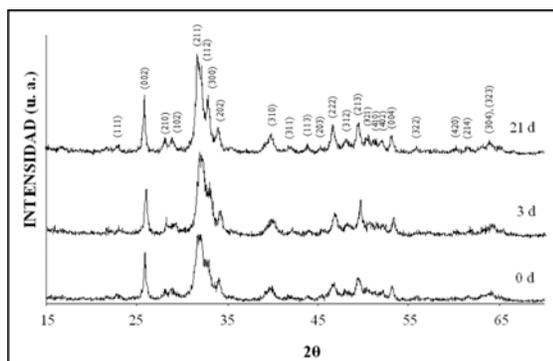
## Caracterización

Los polvos fueron caracterizados por Difracción de Rayos X (DRX) en un difractor Siemens D5005 empleando radiación  $\text{CuK}\alpha$  y un filtro de Ni, a 40 kV y 20 mA. El estudio de la morfología y el tamaño de partícula se llevó a cabo a través de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), empleando un microscopio Philips CM10 operado a 80 kV y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), realizada en un microscopio Hitachi FESEM 4500. La espectroscopía de infrarrojo (IR) se realizó en un espectrofotómetro Perkin Elmer 283 en el intervalo de 3700–400  $\text{cm}^{-1}$ . La relación Ca/P de las muestras se llevó a cabo a partir del análisis químico por Espectroscopia de Emisión Atómica empleando un espectrómetro de ICP–AES Perkin Elmer Optima 3000.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

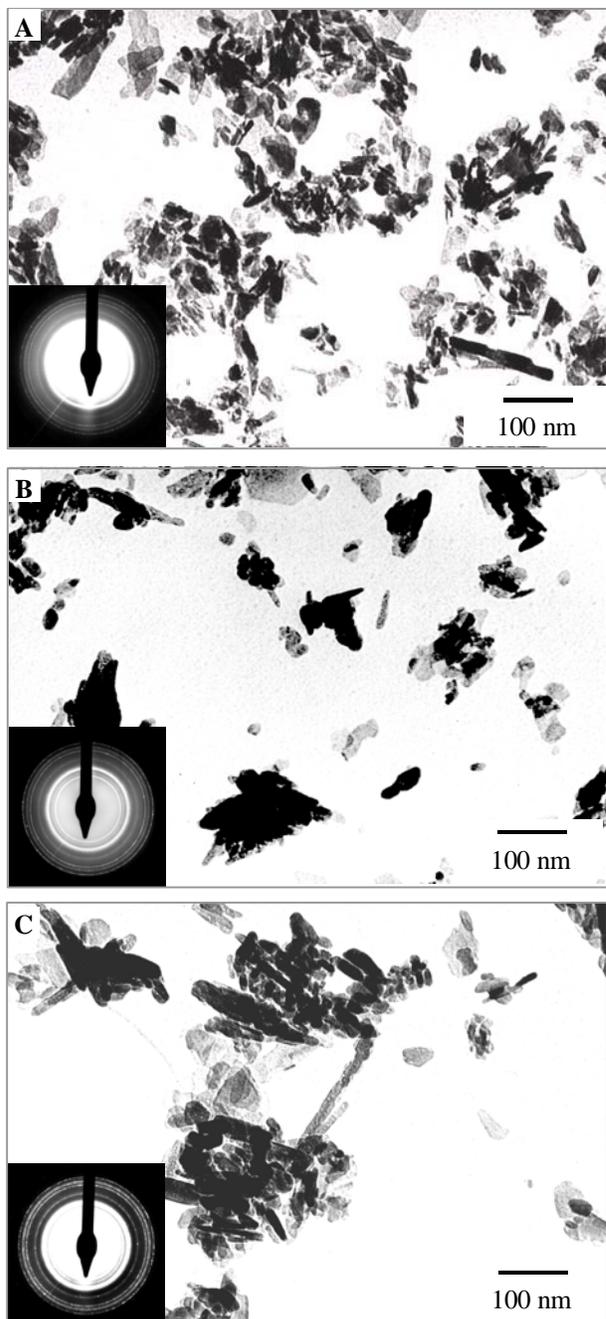
### Síntesis por el Método 1

La figura 1 presenta los patrones de DRX de las muestras sintetizadas y envejecidas a 25 °C entre 0 y 21 d. El material obtenido en la síntesis fue caracterizado como HA según los patrones de difracción presentados por el ICDD–JCDPS identificado con el número #09–0432. A medida que transcurre el tiempo de envejecimiento, la intensidad de los picos aumenta ligeramente, pero manteniéndose picos anchos aún después de 21 d.



**Figura 1.** Patrón de DRX de polvos de Hidroxiapatita obtenidos siguiendo el método 1, sintetizados y envejecidos a 25 °C por diferentes tiempos.

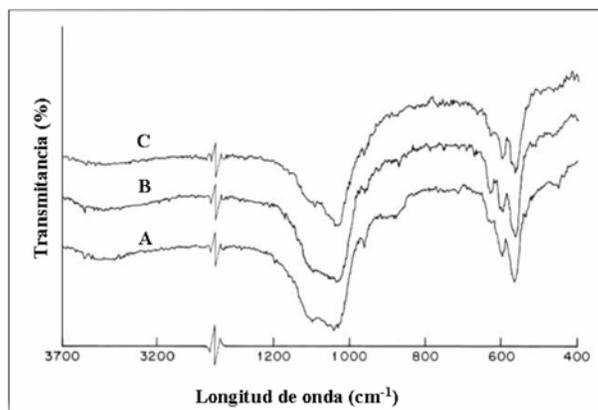
Las imágenes de MET de los productos se presentan en la figura 2. Los patrones de difracción de electrones corresponden a HA. Se pueden observar dos morfologías: partículas alargadas o aciculares y partículas de extremos redondeados de diferentes tamaños, siendo todas de dimensiones nanométricas.



**Figura 2.** Imágenes de campo claro de MET de polvos de Hidroxiapatita obtenidos siguiendo el método 1, sintetizados y envejecidos a 25 °C por diferentes tiempos: A. 0, B. 3 y C. 21 días.

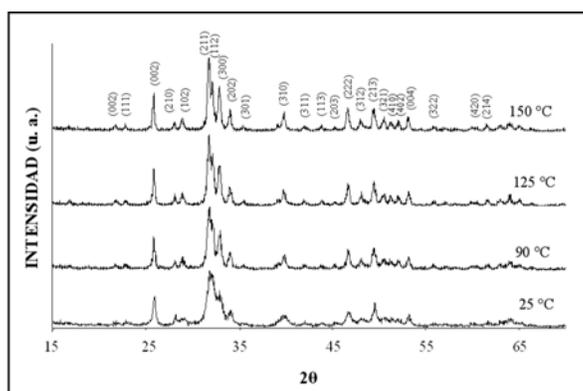
Esta morfología fue reportada previamente por Bouyer *et al.*, 2000, como parte del sistema  $P_2O_5-H_3PO_4-H_2O$ .

Los espectros de IR de las muestras sintetizadas y envejecidas a 25 °C se presentan en la figura 3, en ella se observan las bandas características de HA, según lo reportado por Rehman y Bonfield (1997). Las bandas hidroxilo se ubican a 3570  $cm^{-1}$ , con baja intensidad para 0, 3 y 21 d. Las bandas fosfato en los espectros IR presentan cuatro modos vibracionales, identificados como  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  y  $\nu_4$ . El modo  $\nu_1$  se localiza a 960  $cm^{-1}$  y está presente en todos los espectros de HA reportados. La banda correspondiente a al modo  $\nu_2$  se ubica entre 470 y 420  $cm^{-1}$ . La banda del modo  $\nu_3$  es más intensa y presenta dos picos, uno a 1090  $cm^{-1}$  y el otro a 1040  $cm^{-1}$ . La banda correspondiente al modo  $\nu_4$  está bien definida en la región entre 660 y 520  $cm^{-1}$ , presentando tres picos característicos: 600, 630 y 570  $cm^{-1}$  (Rehman, 1997). Todos los espectros de HA analizados para la síntesis y envejecimiento a 25 °C por diferentes tiempos muestran los modos vibracionales  $\nu_1$ ,  $\nu_3$  y  $\nu_4$  bien definidos e intensos.



**Figura 3.** Espectros de IR de polvos de Hidroxiapatita obtenidos siguiendo el método 1, sintetizados y envejecidos a 25 °C por diferentes tiempos: A. 0 d, B. 3 d y C. 21 días.

Los patrones de DRX de las muestras sintetizadas a 25 °C y envejecidas a diferentes temperaturas por 3 d, se presentan en la figura 4, la cual incluye el patrón de 25 °C a 3 días para efectos de comparación. Todos los patrones fueron identificados como HA.

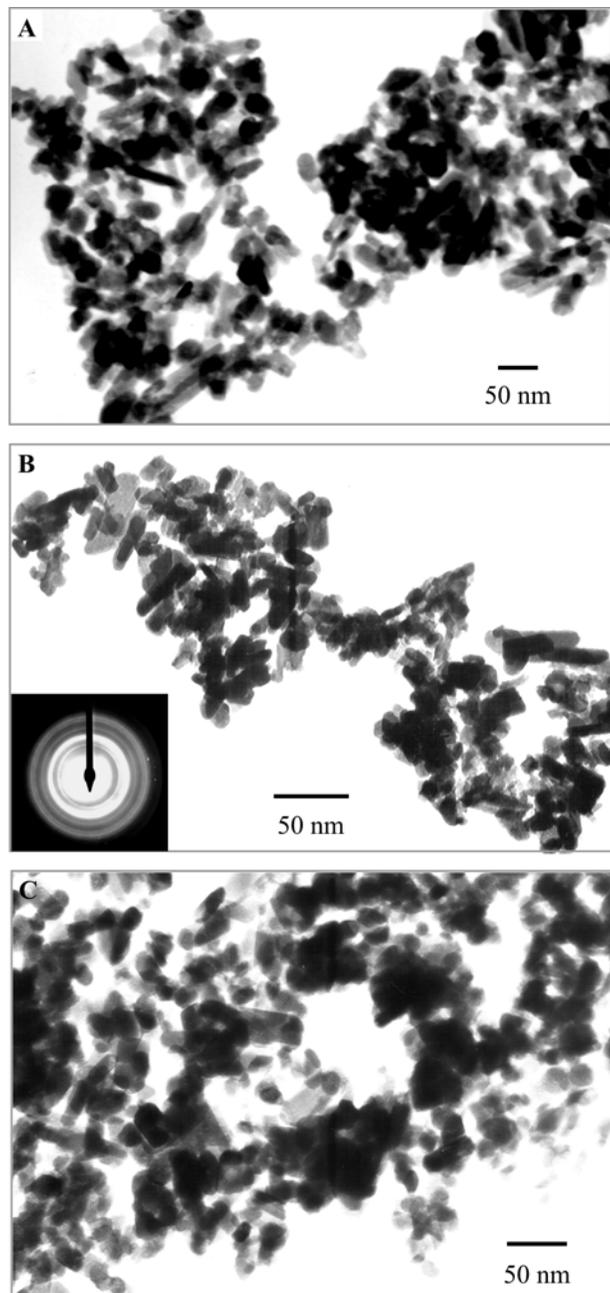


**Figura 4.** Patrón de DRX de polvos de HA obtenidos siguiendo el método 1, sintetizados a 25 °C y envejecidos por 3 días a diferentes temperaturas.

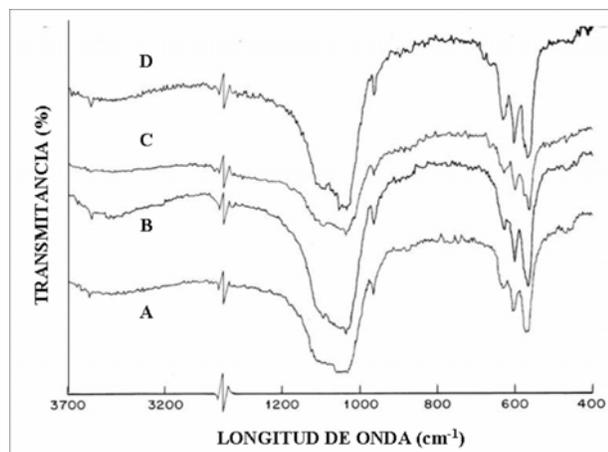
Las imágenes de MET de los polvos de HA envejecidos a mayores temperaturas se presentan en la figura 5. La morfología deja de ser predominantemente acicular, encontrándose partículas aciculares, placas alargadas y partículas redondeadas de menores dimensiones. Bouyer *et al.*, (2000) reportan un cambio en dirección de crecimiento de las partículas con aumento en la temperatura: a temperaturas inferiores a 60 °C la dirección preferencial de crecimiento se encuentra en la dirección del eje *c* de la celda cristalina (pico correspondiente a la familia del plano de Miller (002), ubicado a 25,9° aproximadamente). Explican

Bouyer *et al.*, (2000) que 60 °C es la temperatura límite donde disminuye la velocidad de nucleación y aumenta la velocidad de crecimiento de partículas. Con respecto a la morfología de las partículas, Müller-Mai *et al.*, (1995), reportan partículas en forma de placas para cristales naturales de hueso y cristales de 47 nm en huesos alveolares humanos.

A mayores temperaturas de envejecimiento, los espectros de IR muestran que las bandas fosfato de los cuatro modos vibracionales se hacen más intensas, ver figura 6 (Rehman, 1997).



**Figura 5.** Imágenes de campo claro de MET de polvos de Hidroxiapatita obtenidos siguiendo el método 1, sintetizados a 25 °C y envejecidos por 3 días a diferentes temperaturas: A. 90, B. 125 y C. 150 °C.



**Figura 6.** Espectros de IR de polvos de Hidroxiapatita obtenidos siguiendo el método 1, sintetizados a 25 °C y envejecidos por 3 días a diferentes temperaturas: A. 25 °C, B. 90 °C, C. 125 °C y D. 150 °C.

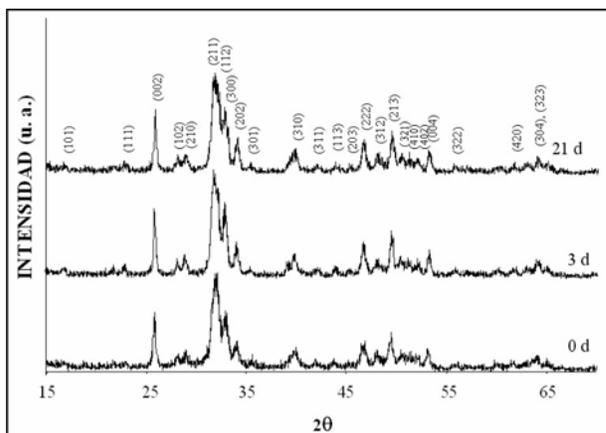
Los resultados de la relación atómica Ca/P para el método 1 se presentan en la tabla 1. Las muestras analizadas presentan una relación Ca/P entre 1,50 y 1,67, por lo que todos los productos obtenidos son no-estequiométricos o deficientes en calcio. Los huesos naturales presentan una fase apatítica mineral no-estequiométrica, cuya presencia en el hueso es en forma de cristales nanométricos de baja cristalinidad y con relación Ca/P entre 1,5 y 1,67 (Yubao *et al.*, 1994), los productos obtenidos por el método 1 se encuentran en este intervalo, lo cual los hace químicamente aptos para aplicaciones médicas, especialmente como sustitutos óseos.

**Tabla 1.** Relación Ca/P de HA sintetizada siguiendo los métodos 1 y 2.

Muestra	Método 1	Método 2
25°C por 0 d	1,55	1,75
25°C por 3 d	1,50	1,57
25°C por 21 d	1,55	1,56
90°C por 3 d	1,57	1,62
125°C por 3 d	1,55	1,61
150°C por 3 d	1,62	1,61

## Síntesis por el Método 2

La figura 7 presenta los patrones de DRX de las muestras de HA sintetizadas y envejecidas a 25 °C por tiempos de 0, 3 y 21 días, empleando el método 2. Los resultados obtenidos confirman la presencia de HA (ICCD–JCDPS #09–0432) en las muestras presentadas.



**Figura 7.** Patrón de DRX de polvos de Hidroxiapatita obtenidos siguiendo el método 2, sintetizados y envejecidos a 25 °C por diferentes tiempos.

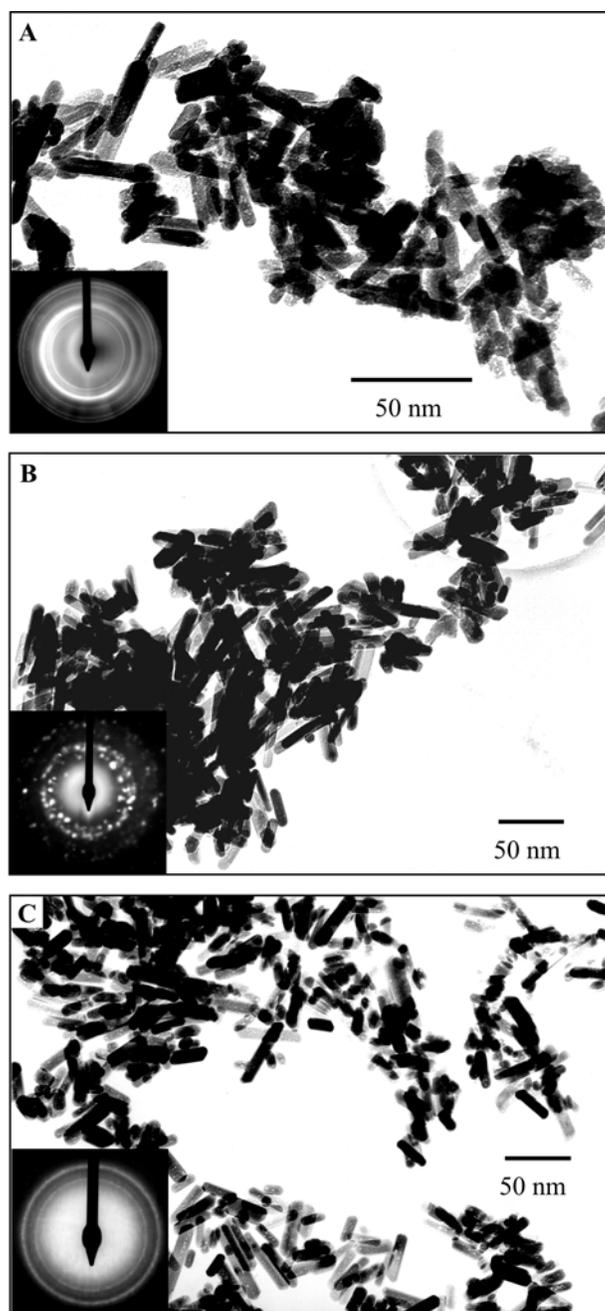
En la figura 8 se presentan las imágenes de MET de las muestras sintetizadas por el método 2. Las partículas son pequeñas y redondeadas a 0 días, pero a 3 y 21 días, crecen con morfología acicular bien definida pero manteniendo su tamaño nanométrico.

Los espectros de IR de las muestras sintetizadas y envejecidas a 25 °C por tiempos de 0, 3 y 21 días, presentan las bandas características de HA y se observan en la figura 9. A 0 días las bandas  $\text{OH}^-$  a 3570 y 630  $\text{cm}^{-1}$  están poco definidas. Las bandas fosfato están presentes, siendo los modos vibracionales más intensos  $\nu_3$  y  $\nu_4$ . Para 3 y 21 días las bandas  $\text{OH}^-$  están bien definidas.

Con respecto a los patrones de DRX de las muestras sintetizadas a 25 °C y envejecidas a mayores temperaturas, estos corresponden a HA. En la figura 10 se presentan los patrones de DRX, incluyendo el patrón de 25 °C a 3 días para efectos de comparación.

Con el incremento de la temperatura de envejecimiento se define la morfología de agujas, tal y como se observa en las imágenes de MET de los polvos de HA sintetizados a 25 °C siguiendo el método 2, envejecidos por 0, 3 y 21 días (figura 11). La morfología y el tamaño de partícula son similares para todas las muestras sintetizadas a altas temperaturas.

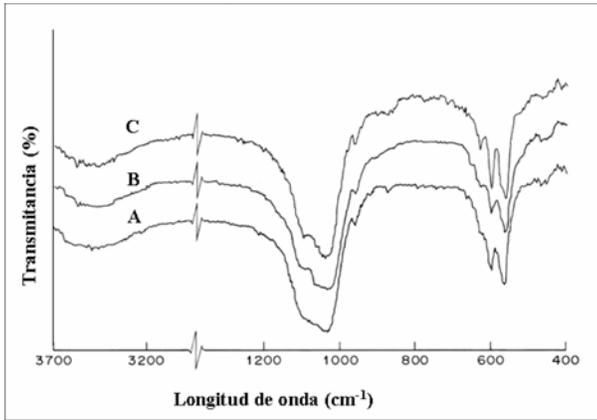
En la figura 12 se presentan imágenes de MEB de polvos de HA sintetizados a 25 °C siguiendo el método 2, en las cuales se pueden observar partículas alargadas, confirmando los resultados obtenidos por MET.



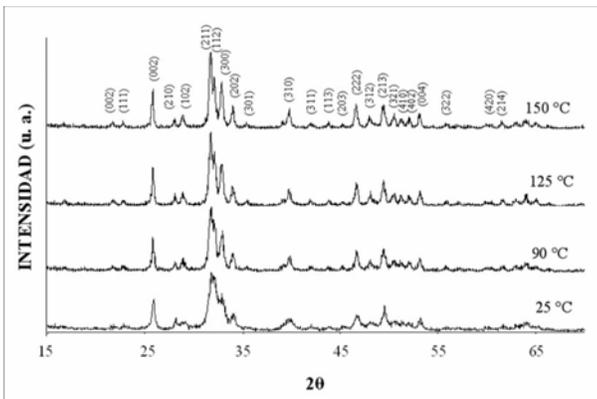
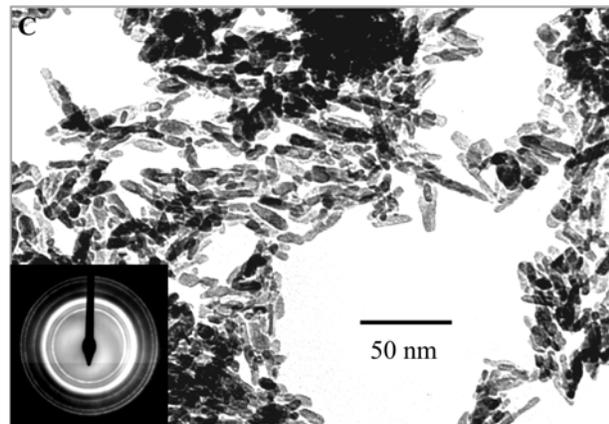
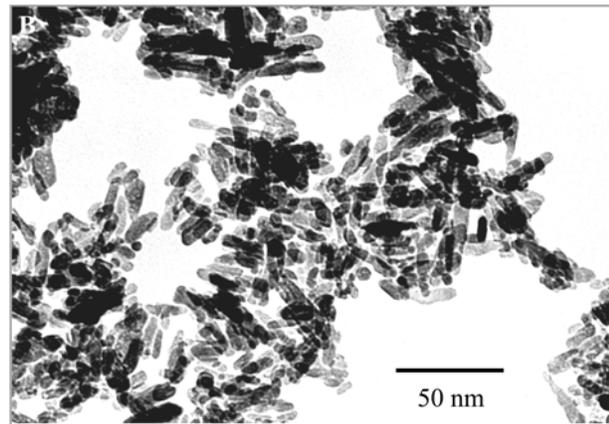
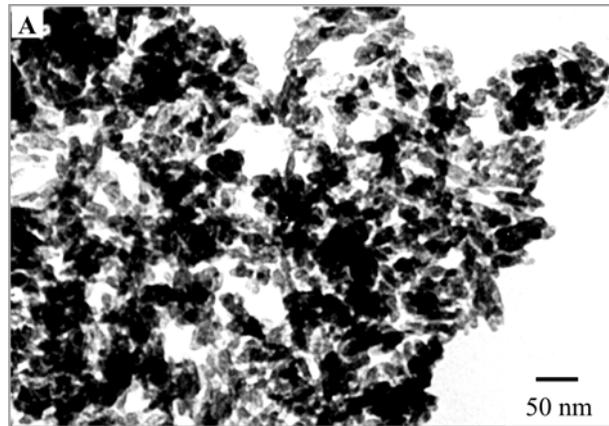
**Figura 8.** Imágenes de campo claro de MET de polvos de Hidroxiapatita obtenidos siguiendo el método 2, sintetizados y envejecidos a 25 °C por diferentes tiempos: A. 0, B. 3 y C. 21 días.

Los espectros de IR son más definidos para las muestras envejecidas a mayores temperaturas (figura 13), presentando de forma clara los picos de las bandas vibracionales de la HA.

La relación Ca/P de las muestras obtenidas siguiendo el método 2 se presentan en la tabla 1. Las muestras presentan una relación Ca/P entre 1,5 y 1,75, lo que indica que se obtuvieron polvos de HA no-estequiométrica, siendo aptos para su uso en aplicaciones médicas, a excepción de la

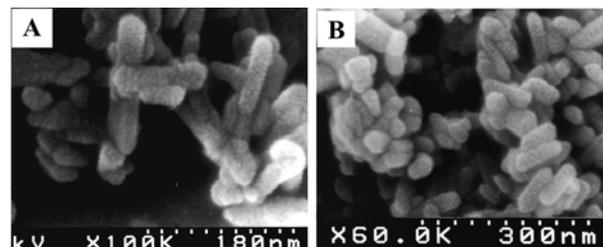


**Figura 9.** Espectros de IR de polvos de Hidroxiapatita obtenidos siguiendo el método 2, sintetizados y envejecidos a 25 °C por diferentes tiempos: A. 0, B. 3 y C. 21 días.

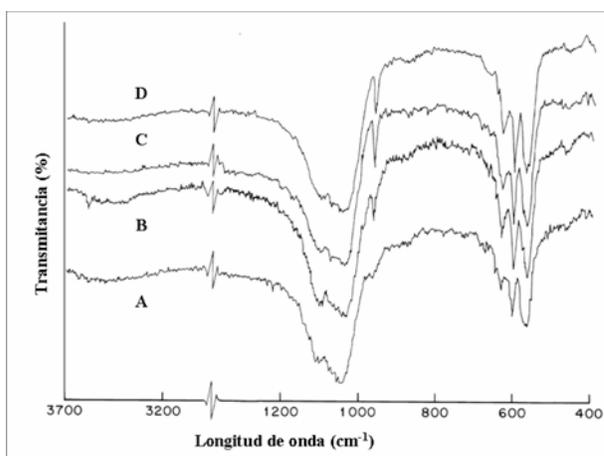


**Figura 10.** Patrón de DRX de polvos de Hidroxiapatita obtenidos siguiendo el método 2, sintetizados a 25 °C y envejecidos por 3 días a diferentes temperaturas.

**Figura 11.** Imágenes de campo claro de MET de polvos de Hidroxiapatita obtenidos siguiendo el método 2, envejecidos por 3 días a diferentes temperaturas: A. 90, B. 125 y C. 150 °C.



**Figura 12.** Imágenes de MEB de polvos de Hidroxiapatita obtenidos siguiendo el método 2, sintetizados a 25 °C y envejecidos por 3 días a temperaturas de A: 90 °C, y B: 125 °C.



**Figura 13.** Espectros de IR de polvos de Hidroxiapatita obtenidos siguiendo el método 2, sintetizados a 25 °C y envejecidos por 3 días a diferentes temperaturas: A. 25 °C, B. 90 °C, C. 125 °C y D. 150 °C.

muestra de 25 °C a 0 d, cuya relación Ca/P excede 1,70, esto según las conclusiones de Yubao *et al.*, (1994).

## CONCLUSIONES

Los polvos obtenidos, siguiendo los dos métodos de síntesis presentados a partir de precursores químicos de calcio y fósforo, corresponden a HA, según la caracterización por DRX e IR. La MET permite observar la morfología y las dimensiones nanométricas de los polvos obtenidos. El análisis químico confirma que los polvos presentan una relación no-estequiométrica Ca/P entre 1,50 y 1,75.

Con ambos métodos se obtienen partículas aciculares que van definiendo la morfología a medida que aumentan el tiempo y la temperatura de envejecimiento, para el método 1 se define la morfología de placas, mientras que para el método 2 la de agujas.

Los polvos obtenidos son, desde el punto de vista de sus características físico-químicas, aptos para su empleo en aplicaciones biomédicas por su tamaño de partícula, morfología y composición química, similares a las del hueso natural.

## AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen el apoyo financiero del FONACIT a través del Proyecto G-200100900.

## REFERENCIAS

BOUYER E., GITZHOFFER F., BOULOS M. I. (2000). Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension. *J. of Mat. Sci.: Mat. in Med.* 11:523-531.

CAO W., HENCH L. L. 1996. *Bioactive Materials.* *Ceram. Intl.* 22: 493-507.

FERNÁNDEZ E., GIL F., GINEBRA M., DRIESENS F., PLANELL J. Y BEST S. (1999). Calcium phosphate bone cements for clinical applications, Part I: solution chemistry. *J. of Mat. Sci.: Mat. in Med.* 10:169-176.

HENCH L. L. (1998). *Bioceramics.* *J. Am. Ceram. Soc.*, 81 [7] 1705-28.

HULBERT S. F. (1990). *CRC Handbook of Bioactive Ceramics,* CRC Press, vol. I, U.S.A.

ITO K., OOI Y. (1990). *CRC Handbook of Bioactive Ceramics,* CRC Press, vol. II, U.S.A.

KOKUBO T., KIM H-M., KAWASHITA M., NAKAMURA T. 2000. *Novel Ceramics for Biomedical Applications.* *J. Aust. Ceram. Soc.*, 36 (1):37-46.

LU J. X., FLAUTRE B., ANSELME K., HARDOUIN P., GALLUR A., DESCAMPS M., THIERRY B. (1999). Role on interconnections in porous bioceramics on bones recolonization in vitro and in vivo. *J. of Mat. Sci.: Mat. in Med.* 10:111-120.

MILOSEVSKI M., BOSSERT J., MILOSEVSKA R., BUCKER M. (1997). Obtaining and properties of dense biohydroxyapatite. *Science of Sintering.* 29 (1):33-41.

MILOSEVSKI M., BOSSERT J., MILOSEVSKI D., GRUEVSKA N. (1999). Preparation and properties of dense and porous calcium phosphate. *Ceram. Intl.* 25:693-696.

MÜLLER-MAI C. M., STUPP S. I., VOIGT C., GROSS U. (1995). Nanoapatite and organoapatite implants in bone: Histology and ultrastructure of the interface. *J. Biom. Mat. Res.* 29:9-18.

NARASARAJU T. S. B., PHEBE D. E. (1996). Review: Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite. *J. Mater. Sci.* 31:1-21.

OONISHI H., HENCH L. L., WILSON J., SUGIHARA F., TSUJI E., KUSHITANI S., IWAKI H. (1999). Comparative Bone Growth Behavior in Granules of Bioceramic Materials of Various Sizes. *J. Biom. Mat. Res.* 44:31-43.

REHMAN I, BONFIELD W. (1997). Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. *J. of Mat. Sci.: Mat. in Med.* 8:1-4.

SPECCHIA N., PAGNOTTA A., CAPELLA M., TAMPIERI A., GRECO F. (2002). Effect of hydroxyapatite porosity on growth

and differentiation of human osteoblast-like cells. *J. Mat. Sci.* 37:577-584.

WANG M., DEB S., BONFIELD W. (2000). Chemically coupled hydroxyapatite-polyethylene composites: processing and characterization»; *Mat. Lett.* 44:119-124.

WILLMAN G. (1996). Medical grade hydroxyapatite: state of the art. *Brit. Cer. Trans.* 95 (5): pp. 212-216.

WILLIAMS D. F. 1987. Review: Tissue-biomaterial interactions. *J. of Mat. Sci.* 22:3421-3445.

YUAN H., YANG Z., LI Y., ZHANG X., DE BRUIJN J. D., DE GROOT K. (1998). Osteoinduction by calcium phosphate ceramics. *J. of Mat. Sci.: Mat. in Med.* 9:723-726.

YUBAO L., DE WIJN J, KLEIN C. P. A. T., VAN DE MEER, DE GROOT K. (1994). Preparation and characterization of nanograde osteoapatite-like rods. *J. of Mat. Sci.: Mat. in Med.* 5:252-255.