

## Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo

Luis Gonzalo Sequeda<sup>1</sup>, José Milciades Díaz<sup>2</sup>, Sandra Janeth Gutiérrez<sup>3</sup>, Sandra Janeth Perdomo<sup>3</sup>, Olga Lucía Gómez<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación Fitoquímica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, carrera 7ª No. 43-82, Bogotá, D. C., Colombia. Correo electrónico: [lsequeda@javeriana.edu.co](mailto:lsequeda@javeriana.edu.co).

<sup>2</sup> Departamento de Física, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, carrera 7ª No. 43-82, Bogotá, D. C., Colombia. Correo electrónico: [jmdiaz@javeriana.edu.co](mailto:jmdiaz@javeriana.edu.co).

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, carrera 7ª No. 40-82, Bogotá, D. C., Colombia. Correos electrónicos: [s.gutierrez@javeriana.edu.co](mailto:s.gutierrez@javeriana.edu.co); [olga.gomez@javeriana.edu.co](mailto:olga.gomez@javeriana.edu.co).

Recibido para evaluación: 10 de febrero de 2012.

Aceptado para publicación: 31 de mayo de 2012.

### RESUMEN

El método de obtención de la hidroxiapatita (HAp) para ser utilizada como sustituto óseo, debe ofrecer un producto de alta pureza, rendimiento, rapidez y bajo costo, y contar con propiedades como bioactividad, biocompatibilidad, osteoconductividad y unión directa al hueso. En este trabajo se elaboró HAp sintética mediante tres métodos reportados en la literatura de vía sinterización y vía precipitación. El material obtenido se caracterizó por espectrometría de absorción atómica (AAS), espectrometría de absorción molecular (UV-Vis), espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (XRD), microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (EDX). La ruta de síntesis de HAp por precipitación ofreció mejores resultados, comparados con la muestra estándar comercial y el hueso bovino, obteniéndose un tamaño de grano aproximado de 1  $\mu\text{m}$ , relación molar Ca/P de 1,7, alta pureza y cristalinidad; mientras que los resultados obtenidos por vía sinterización mostraron la presencia de fases amorfas. El método de síntesis por precipitación vía húmeda usando nitratos de calcio y fosfatos, mostró ser práctico y adecuado para realizar la inmovilización de HAp sobre un soporte metálico como silicio, importante para su uso en cirugía reconstructiva en el área odontológica y médica.

*Palabras clave:* hidroxiapatita (HAp), hueso bovino, UV-Vis, FTIR, XRD, SEM, EDX.

## SUMMARY

### Synthetic hydroxyapatite obtaining using three different methods and characterization to use it as bone substitute

The method by which to obtain Hydroxyapatite to be used as bone substitute should offer specific qualities such as, high purity, performance, low cost and has to be the following, bioactive, biocompatible, it has to have osteoconductivity and it has to bond directly to the bone. In this paper, synthetic HAp was prepared using 3 different methods reported in the literature as a route via sintering and precipitation, and subsequently characterized by atomic absorption spectrometry (AAS), molecular absorption spectrometry (UV-Vis), infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive spectroscopy X-ray (EDX). The route of synthesis of HAp precipitation gives better results, compared to the commercial standard sample and bovine bone, such as grain size which is of about 1  $\mu\text{m}$ , molar ratio Ca/P of 1.7, high purity and crystallinity, while the results obtained via sintering show the presence of amorphous phases. The synthesis method using a wet precipitation of calcium nitrates and phosphates is practical and suitable for the immobilization of HAp on a metal substrate such as silicon, important for the use in dental and medical reconstructive surgery.

*Key words:* hydroxyapatite (HAp), bovine bone, UV-Vis, FTIR, XRD, SEM, EDX.

## INTRODUCCIÓN

La ingeniería de tejidos ha desarrollado biomateriales para ser utilizados en el reemplazo de tejidos que se hayan perdido en el cuerpo humano. En el caso de defectos óseos, ya sea por alguna injuria o por enfermedad, el hueso xenogénico, usualmente de origen bovino, se ha convertido en una alternativa para este reemplazo por su bajo costo y facilidad de obtención. El problema yace en el riesgo de infección, reacción inmunológica e irritación que puede llegar a causar (1). Ante esto, la hidroxiapatita sintética (HAp),  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , se presenta como una buena opción, pues ella es el mayor componente inorgánico del hueso mineral y se considera el material más atractivo para implante óseo, debido a su similitud tanto en composición como en características biológicas con el hueso natural (2). Hasta ahora este material se ha usado para varias aplicaciones biomédicas, entre ellas el recubrimiento de implantes por su excelente bioactividad, promoción de la función celular y osteoconductividad. Además, varios autores (3) señalan que la HAp puede unirse directamente a los tejidos y promo-

ver su crecimiento. Su principal problema radica en su baja resistencia mecánica, por lo que cada vez es menos utilizada en implantes que requieren permanecer largo tiempo y soportar alta carga, siendo más utilizada como relleno de bolsas periodontales, regiones adyacentes a implantes y defectos de huesos largos.

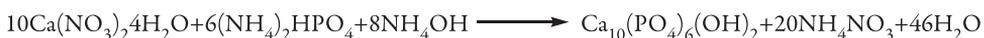
La resistencia mecánica de la HAp, depende del tamaño del grano, su distribución, porosidad y otros defectos microestructurales (4, 5), por lo que la HAp ha sido sintetizada por varios métodos, entre los que se encuentran: el químico-húmedo en solución acuosa (6); el sol-gel (7, 8); el hidrotermal (9); la deposición térmica (6); la precipitación continua y el método de reacción en estado sólido (10). Teniendo en cuenta lo anterior, una nueva generación de materiales porosos sintéticos de hidroxiapatita (HAp), fabricados con el proceso de bloques sólidos, ha surgido, con el fin de reproducir mejor las características del hueso (11-13). Éstos se han clasificado de acuerdo con el tamaño y la estructura del poro. En cuanto al tamaño del poro, el más adecuado es el que va en un rango de 100-300  $\mu\text{m}$  y respecto a la estructura del poro, es vital que éstos se encuentren interconectados (14, 15).

Puesto que actualmente uno de los principales enfoques de la ingeniería de tejidos es la regeneración ósea, es necesario considerar la producción de materiales biocompatibles con características muy similares al hueso, que permitan la migración celular, vascularización y difusión de nutrientes. Basados en estas consideraciones, este trabajo reporta la elaboración de HAp sintética mediante tres métodos y su posterior caracterización, con el fin de determinar con cuál de los métodos utilizados se obtiene un material sintético con mejores propiedades y similares características al hueso natural bovino, para ser utilizado en un futuro como material de andamiaje en regeneración ósea periodontal y ortopédica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Síntesis

**Método 1.** En un erlenmeyer se vertió 900 mL de nitrato de calcio tetrahidratado  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  de concentración 0,333 M; se adicionaron 1.500 mL de fosfato monoácido de diamonio  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  a una concentración de 0,12 M a una velocidad de 1 mL/min, y 75 mL de amoníaco  $\text{NH}_4\text{OH}$ , manteniendo el sistema a 90 °C en agitación durante 1 h. Se obtuvo la siguiente reacción química:



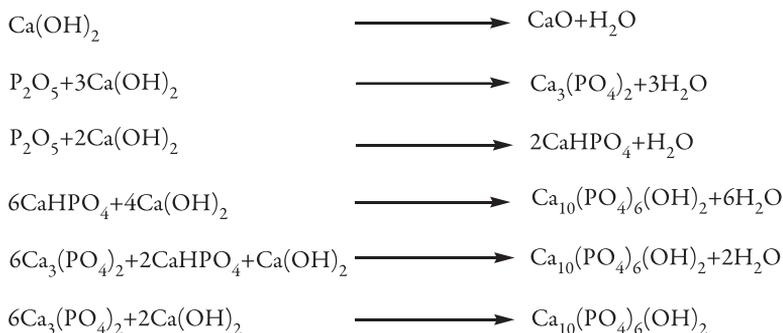
La solución se dejó en reposo durante diez días a temperatura ambiente. El precipitado obtenido se lavó varias veces con agua destilada y se secó a 250 °C durante 1 h; luego este precipitado se calcinó a 1.000 °C durante 3 h (16).

**Método 2.** Se mezclaron 400 mL de una solución de 0,6 M de  $H_3PO_4$  y 400 mL de una suspensión de 1,0 M de hidróxido de calcio  $Ca(OH)_2$ , a una velocidad de 5 mL/min. Se obtuvo la siguiente reacción:



El pH de la mezcla se ajustó entre 11 y 12; ésta se sometió a calentamiento durante 1 h a 90 °C, para activar la reacción química; luego se agitó durante otra hora. Posteriormente, se procedió a dejar en reposo la solución a temperatura ambiente durante 72 h. Al finalizar el tiempo de envejecimiento, la HAp precipitada se lavó con agua destilada hasta pH neutro. El polvo de HAp se llevó a la mufla a 1.000 °C durante 3 h (17).

**Método 3.** Se mezclaron 7,76 g de hidróxido de calcio,  $Ca(OH)_2$ , con 4,30 g de pentóxido de fósforo ( $P_2O_5$ ) en un mortero cerámico; luego se compacta a una presión de 7 ton/cm<sup>2</sup> durante 30 min. El bloque de la mezcla se llevó a sinterización en mufla a 1.000 °C durante 3 h (18). Las reacciones químicas durante el proceso fueron:



## CARACTERIZACIÓN

**Espectrometría de absorción atómica (AAS).** Las muestras se disolvieron en medio ácido. El calcio se determinó por espectrometría de absorción atómica de llama (AAS), mediante un espectrómetro *Varian 140* usando llama acetileno-óxido nitroso, a una longitud de onda de 442,7 nm. Como estándar de calcio se usó una solución de 1.000 ppm de J. T. Baker y óxido de lantano (*Sigma*) a 500 ppm (19).

**Espectrometría de absorción molecular (UV-Vis).** A las muestras disueltas se les determinó el contenido de fósforo por espectrometría de absorción molecular UV-Vis,

mediante la formación de un complejo de fosfovanadomolibdato, analizado a 420 nm usando un espectrómetro UV-Vis Varian Cary 100. Las soluciones estándar de fosfato se prepararon a partir de fosfato diácido de potasio y del reactivo de vanadomolibdato (molibdato de amonio y metavanadato de amonio), sales provenientes de J. T. Baker, respectivamente (19).

**Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).** La determinación de frecuencias de vibración características de la hidroxiapatita, en el rango de 4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , se determinó en un equipo IR Shimadzu Prestige 21 donde las muestras en polvo son suspendidas en KBr grado espectroscópico de Sigma (20).

**Difracción de rayos X (XRD).** Los difractogramas de rayos X se obtuvieron en un equipo Panalytical X'Pert PRO MPD con los siguientes parámetros: rango de medición entre 2° y 90° ( $2\theta$ ), tamaño de paso 0,02° ( $2\theta$ ), tiempo por paso 0,4 s, radiación  $\text{CuK}\alpha 1$  ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ), detector LynxEye; la identificación cualitativa de las fases cristalinas presentes en las muestras se realizó mediante comparación de las reflexiones del perfil, medido con las reflexiones de los perfiles de difracción reportados en la base de datos Powder Diffraction File (PDF-2) del International Centre for Diffraction Data (ICDD) utilizando el software Search Match (19, 21).

**Microscopía electrónica de barrido (SEM-EDX).** La morfología de las partículas se evaluó usando microscopía electrónica de barrido (SEM) en un equipo JEOL modelo JSM 6490-LV operado en el modo de alto vacío, equipado con detectores que permiten la obtención de imágenes de electrones retrodispersados; el detector de espectroscopía por dispersión de energía (EDX) permitió la realización del microanálisis cualitativo (21).

### Muestras de hueso bovino y patrón

Las muestras de hueso bovino (fémur) se tomaron del mercado local y se les realizó un proceso de limpieza y desinfección para retirar tejidos, material orgánico y microorganismos. Se utilizó agua caliente para la extracción de la médula ósea, soda (NaOH al 2%) para retirar grasas y proteínas, solución antiséptica al 1% para evitar el crecimiento de microorganismos y abundante agua para eliminar trazas de las soluciones de limpieza y desinfección; posteriormente, se sometieron a tratamiento térmico a 1.000 °C durante 3 h para eliminar todo el material orgánico. Al fémur se le realizó cortes para separar el hueso laminar y el hueso poroso. Como muestra patrón se usó Calcitite® (Zimmer Dental) (22).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Síntesis

**Métodos 1 y 2 – Precipitación (vía húmeda).** La obtención de HAp por precipitación presentó ventajas por su costo, rendimiento y simplicidad, factores importantes para su posterior uso práctico en la inmovilización de HAp sobre un soporte metálico como silicio poroso. La influencia de variables como pH, temperatura y orden de mezcla de los reactivos son factores fundamentales en la síntesis; autores como García *et al.*, han documentado su control (23). En nuestro caso, el valor del pH durante la reacción se mantuvo por encima de 11, valores inferiores promueven la formación de fosfatos de calcio. La velocidad de adición de los reactivos se realizó entre 1 y 5 mL por min, agregando la solución de fosfatos correspondiente sobre la solución de calcio, que favoreció la nucleación de HAp. Se ha reportado que a mayores flujos se incrementa la formación de especies de fosfato de calcio amorfo (24-26). En la síntesis, utilizando el método 2 es posible obtener  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  gracias al descenso rápido en el pH causado por la adición de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , lo que a su vez permite que la especie predominante  $\text{PO}_4^{3-}$  no esté en una concentración suficiente para formar HAp estequiométrica ( $\text{Ca}/\text{P} = 1,67$ ). También, debido al ácido fosfórico, que es un ácido triprótico de naturaleza débil, no se disocia completamente, lo cual favorece la obtención de HAp deficiente en calcio (27, 28).

**Método 3 – Sinterización en estado sólido.** La sinterización se realizó mediante la compactación de los reactivos sólidos y el posterior sometimiento de esta mezcla a altas temperaturas de calentamiento. En este proceso de reacción química irreversible realizado a partir de los reactivos y densificación de los polvos, se produce una disminución de la energía libre, debida a la superficie de las partículas, a la presión y temperatura aplicada. Es así que el beneficio de este tipo de reacción es la eliminación de la calcinación en la formación de sólidos (29, 30).

En los métodos 1 a 3, se mencionaron algunas ventajas como costo, rendimiento y simplicidad. En la tabla 1 se indican los parámetros relacionados con las ventajas y desventajas y la forma como se evaluaron en el trabajo.

Tabla 1. Parámetros comparativos en los métodos de síntesis.

Parámetro	Método 1	Método 2	Método 3
Costo reactivos <sup>1</sup>	10,5	20,1	18,7
Rendimiento (%) <sup>2</sup>	30	18	> 80
Impurezas <sup>3</sup>	No	Sí	Sí
Tiempo por muestra	36 h	30 h	30 h
Control de pH	> 11	> 11	No

<sup>1</sup> Valor estimado bajo la relación gramo por dólar o mililitro por dólar.

<sup>2</sup> Gramos de hidroxiapatita obtenidos por cada 100 g de reactivos.

<sup>3</sup> Determinación realizada por XRD.

## CARACTERIZACIÓN

*Determinación del contenido de calcio y fósforo por AAS y UV-Vis.* Los resultados se muestran en la tabla 2, y oscilaron entre 40,04% y 42,58% en contenido de calcio para las muestras obtenidas por síntesis, método 3 vía sinterización y método 1 vía precipitación, respectivamente; mientras que las muestras de hueso bovino estuvieron entre 39,26% y 39,91% en calcio para hueso laminar y hueso poroso, en su orden. El contenido de calcio en la muestra comercial, calcitita, fue de 42,04%, considerada como una muestra patrón. El contenido de fósforo en todas las muestras fue similar, entre 17,83% y 18,65% para las muestras de síntesis por el método 3 (sinterización) y síntesis por el método 1 (precipitación), respectivamente; y en 18,32% a 18,43% para el hueso poroso y la calcitita, en su orden. La relación calcio a fósforo se encontró en 1,65 a 1,69 en las muestras de hueso bovino y en 1,73 a 1,77 para las muestras de síntesis. En la muestra de calcitita, la relación fue de 1,76. El análisis de varianza (ANAVA) de una vía ( $p = 0,05$ ) para las muestras de síntesis, y las muestras de hueso bovino, para los contenidos de calcio y fósforo no evidencian diferencias significativas. El “ $p$  valor” en el ANAVA para el contenido de calcio en síntesis y hueso bovino fue de 0,20 y 0,69, respectivamente, y en el contenido de fósforo fue de 0,45 y 0,90, respectivamente. El análisis estadístico usando la prueba Dunnett, comparación del contenido promedio de calcio y fósforo para las síntesis 1 a 3, hueso bovino laminar y poroso, con un control como es la calcitita, indica que no hay diferencias entre los valores obtenidos con el patrón (véase tabla 3).

Tabla 2. Contenido de calcio (%)<sup>1</sup> en muestras de hidroxiapatita, estándar comercial y hueso bovino.

Muestra	Porcentaje de calcio <sup>2</sup>			Porcentaje de fósforo <sup>3</sup>			Relación Ca/P <sup>4</sup>		
		±			±			±	
Método 1	42,58	±	2,29	18,65	±	1,43	1,77	±	0,07
Método 2	41,45	±	1,80	18,60	±	1,31	1,73	±	0,08
Método 3	40,04	±	1,27	17,83	±	1,35	1,74	±	0,09
Calcitita <sup>5</sup>	42,04	±	1,38	18,43	±	1,12	1,76	±	0,05
Hueso poroso	39,91	±	1,04	18,32	±	1,03	1,69	±	0,06
Hueso laminar	39,26	±	1,16	18,41	±	1,04	1,65	±	0,05

<sup>1</sup> Promedio (n = 4).

<sup>2</sup> Resultados obtenidos por AAS.

<sup>3</sup> Resultados obtenidos por UV-Vis.

<sup>4</sup> Mol/mol.

<sup>5</sup> Muestra patrón de hidroxiapatita comercial.

Tabla 3. Comparación del contenido de calcio y fósforo con un control (prueba de Dunnett).

Calcio (%)	$\bar{y}_i^1$	$\bar{y}_i - \bar{y}_c^2$	$ \bar{y}_i - \bar{y}_c ^3$	D <sup>4</sup>	$ \bar{y}_i - \bar{y}_c  \geq D$	Acepto Ho <sup>5</sup>
Método 1	42,58	0,54	0,54	3,03	No	Sí
Método 2	41,45	-0,58	0,58	3,03	No	Sí
Método 3	40,04	-1,99	1,99	3,03	No	Sí
Calcitita <sup>6</sup>	42,04	0,00	0,00	3,03	No	Sí
Hueso poroso	39,91	-2,12	2,12	3,03	No	Sí
Hueso laminar	39,26	-2,77	2,77	3,03	No	Sí
Fósforo (%)	$\bar{y}_i^1$	$\bar{y}_i - \bar{y}_c^2$	$ \bar{y}_i - \bar{y}_c ^3$	D <sup>4</sup>	$ \bar{y}_i - \bar{y}_c  \geq D$	Acepto Ho <sup>5</sup>
Método 1	18,65	0,22	0,22	0,00	No	Sí
Método 2	18,60	0,17	0,17	2,39	No	Sí
Método 3	17,83	-0,60	0,60	2,39	No	Sí
Calcitita <sup>6</sup>	18,43	0,00	0,00	2,39	No	Sí
Hueso poroso	18,32	-0,11	0,11	2,39	No	Sí
Hueso laminar	18,41	-0,02	0,02	2,39	No	Sí

<sup>1</sup> Promedio de la muestra "i" (n = 4).

<sup>2</sup> Diferencia entre el promedio "i" y el promedio control.

<sup>3</sup> Valor absoluto de la diferencia entre el promedio "i" y el promedio control.

<sup>4</sup> Estadístico D calculado.  $D = d_{(\alpha,k,r)} \cdot \sqrt{(2 \cdot s^2/r)}$ .

$d_{(0,05,5,18)} = 2,76$ .

<sup>5</sup> Planteamiento de hipótesis.  $H_0 : \mu_i = \mu_c$   $H_1 : \mu_i \neq \mu_c$ .

<sup>6</sup> Control (muestra patrón).

**Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).** La figura 1 corresponde a los espectros FTIR de las tres síntesis de HAp, del patrón calcitita y del hueso bovino (laminar y poroso). En la caracterización por FTIR se identificaron las bandas de los grupos hidroxilo ( $\text{OH}^{1-}$ ) aproximadamente en  $3.572$  y  $631 \text{ cm}^{-1}$  que corresponden a vibraciones de tipo estiramiento y flexión, respectivamente; las bandas de los grupos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) entre  $2.200$ - $1.950$  (sobretonos),  $1.090$ ,  $1.040$ ,  $962$ ,  $601$ ,  $574$  y  $472 \text{ cm}^{-1}$  son debido a vibraciones de tipo estiramiento y cambio en el ángulo de enlace; impurezas como carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) muestran bandas de tipo flexión en  $1.540$  y  $1.455 \text{ cm}^{-1}$  producto del intercambio de  $\text{OH}^{1-}$  por  $\text{CO}_3^{2-}$  y bandas en  $1.450$  y  $1.410 \text{ cm}^{-1}$  debido al intercambio de  $\text{PO}_4^{3-}$  por  $\text{CO}_3^{2-}$ ; impurezas como hidrogenofosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) vibran en forma de flexión aproximadamente en  $875 \text{ cm}^{-1}$ ; las vibraciones de tipo flexión de los silicatos ( $\text{SiO}_3^{2-}$ ) se encuentran en  $890$ ,  $830$  y  $750 \text{ cm}^{-1}$ ; y vibraciones correspondientes a moléculas de agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) entre  $3.700$ - $2.500 \text{ cm}^{-1}$  y  $1.630 \text{ cm}^{-1}$  (19, 31). La comparación de los espectros muestra que en el espectro FTIR correspondiente al método 3 no hay presencia de vibraciones de los grupos  $\text{OH}^{1-}$ ; sólo hay algunas vibraciones de los grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  en  $1.088$ ,  $1.041$  y  $602 \text{ cm}^{-1}$ , la banda en  $879 \text{ cm}^{-1}$  se produce por la vibración de impurezas de tipo  $\text{HPO}_4^{2-}$ ; el espectro FTIR para el método 2 muestra vibraciones del grupo  $\text{CO}_3^{2-}$  indicando que existe sustitución de grupos hidroxilo y grupos fosfato por carbonatos correspondiente al compuesto carbohidroxiapatita de tipo A y de tipo B, respectivamente; mientras que el espectro FTIR del método 1 se observan vibraciones de los grupos hidroxilo y fosfato, sin impurezas, y la nitidez de las bandas en  $636$ ,  $601$  y  $574 \text{ cm}^{-1}$ , indican que se obtuvo HAp de muy buena cristalización (19, 32). Los resultados de las muestras de hueso tanto laminar como poroso reflejan vibraciones de los grupos hidroxilo y fosfato, evidenciando bandas nítidas de HAp con excelente cristalización aproximadamente en  $631$ ,  $601$  y  $574 \text{ cm}^{-1}$ ; igualmente contienen carbohidroxiapatita de tipo A (sustitución de  $\text{OH}^{1-}$  por  $\text{CO}_3^{2-}$ ) y de tipo B (sustitución de  $\text{PO}_4^{3-}$  por  $\text{CO}_3^{2-}$ ) (19, 22). La muestra patrón de calcitita presenta bandas vibracionales correspondiente a los grupos hidroxilo ( $3.572$  y  $631 \text{ cm}^{-1}$ ), fosfato ( $1.087$ ,  $1.041$ ,  $964$ ,  $605$ ,  $578$  y  $478 \text{ cm}^{-1}$ ), carbohidroxiapatita de tipo A ( $1.546$  y  $1.458 \text{ cm}^{-1}$ ), tipo B ( $1.408 \text{ cm}^{-1}$ ) e impurezas de fosfato monoácido ( $879 \text{ cm}^{-1}$ ) (33). Todas las muestras exhiben vibraciones de tipo estiramiento aproximadamente en  $1.630 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la absorción de agua.

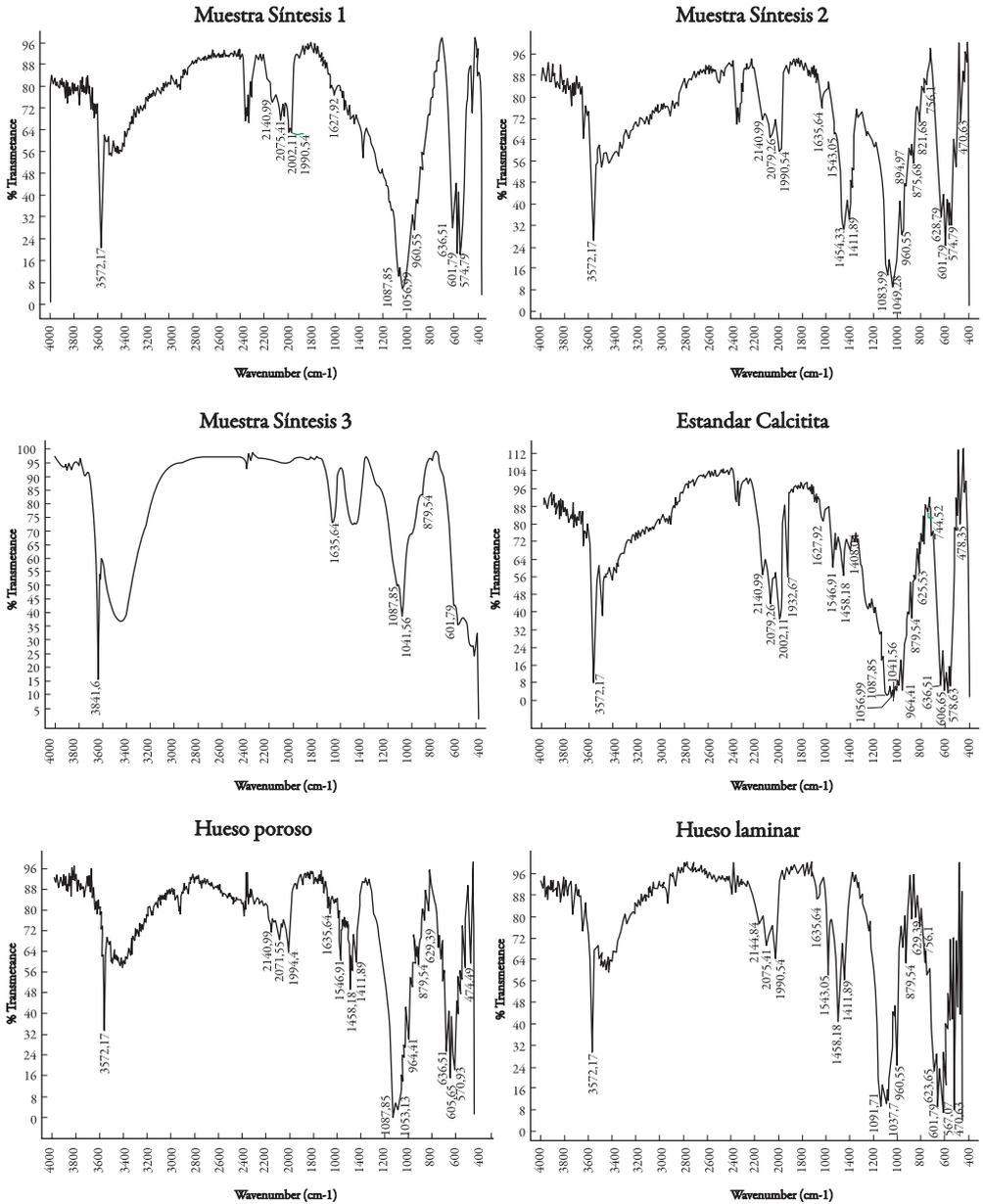


Figura 1. Espectros IR de muestras de síntesis de HAp, hueso bovino y calcitita.

**Difracción de rayos X (XRD).** Los difractogramas de rayos X de las muestras se observan en la figura 2, en donde se encuentran picos estrechos y de mayor intensidad a medida que se aumenta el tiempo de permanencia, e indican buena cristalinidad. En el análisis cualitativo de cada uno de los difractogramas, están presentes las reflexiones correspondientes a los compuestos identificados a partir del perfil de difracción que se encuentran en la base de datos PDF-2 del International Centre for Diffraction Data (ICDD). Para la muestra correspondiente a la síntesis 1, sólo se identificó la hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (84-1.998); para la síntesis 2 se identificaron la hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (84-1.998) y el limo  $\text{CaO}$  (78-649); para la síntesis 3 se identificaron la hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (84-1.998), whitlockita  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (9-169), la portlandita  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (87-673) y coesita  $\text{SiO}_2$  (73-1.748), la presencia de esta fase podría ser atribuida a contaminación cruzada procedente del material de vidrio utilizado en la preparación de las soluciones de los reactivos o trazas de silicio en los reactivos de partida. En las muestras correspondientes a hueso laminar se identificaron las fases hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (00-024-0033) e hidróxido de hidrógeno fosfato cálcico  $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$  (00-046-0905); para el hueso poroso las fases identificadas corresponden a hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (00-024-0033), fosfato de calcio hidratado  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  (00-018-0303) y carbonato de calcio  $\text{CaCO}_3$  (01-086-2341) (33, 34). Por último, en la muestra patrón calcitita se identificaron las fases hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (00-024-0033), óxido de fosfato cálcico  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$  (01-089-6495) y apatita A  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)(\text{OH})$  (01-072-7532).

**Microscopía electrónica de barrido (SEM-EDX).** Los resultados de las imágenes obtenidas por SEM se muestran en la figura 3. Las síntesis 1 y 2 generaron morfologías y tamaños de grano de tipo globular, cristales bien definidos entre 1 y 3  $\mu\text{m}$ ; mientras que en la síntesis 3 se encuentran agregados de mayor tamaño entre 5 y 10  $\mu\text{m}$ , sin morfología definida. La muestra patrón de calcitita presenta morfología irregular pero compacta, tamaño de grano superior a 10  $\mu\text{m}$ , y hojuelas entre 1 y 2  $\mu\text{m}$  sobre la superficie del grano. Las muestras correspondientes al hueso bovino de tipo poroso presentan morfología globular con tamaño de grano entre 1 y 2  $\mu\text{m}$ , poros entre 1 y 7  $\mu\text{m}$ ; en el hueso laminar se encuentran varias formas de morfología con tamaños de grano menores a 0,5  $\mu\text{m}$  y granos de bordes irregulares superiores a 2  $\mu\text{m}$ . El microanálisis por espectroscopía por dispersión de rayos X (EDX) de tipo cualitativo reveló presencia de calcio, fósforo y oxígeno en todas las muestras. La técnica de mapeo químico con EDX (la cual no se presenta), se empleó para determinar la distribución en la composición química, y todas las muestras revelaron formación homogénea (33, 35).

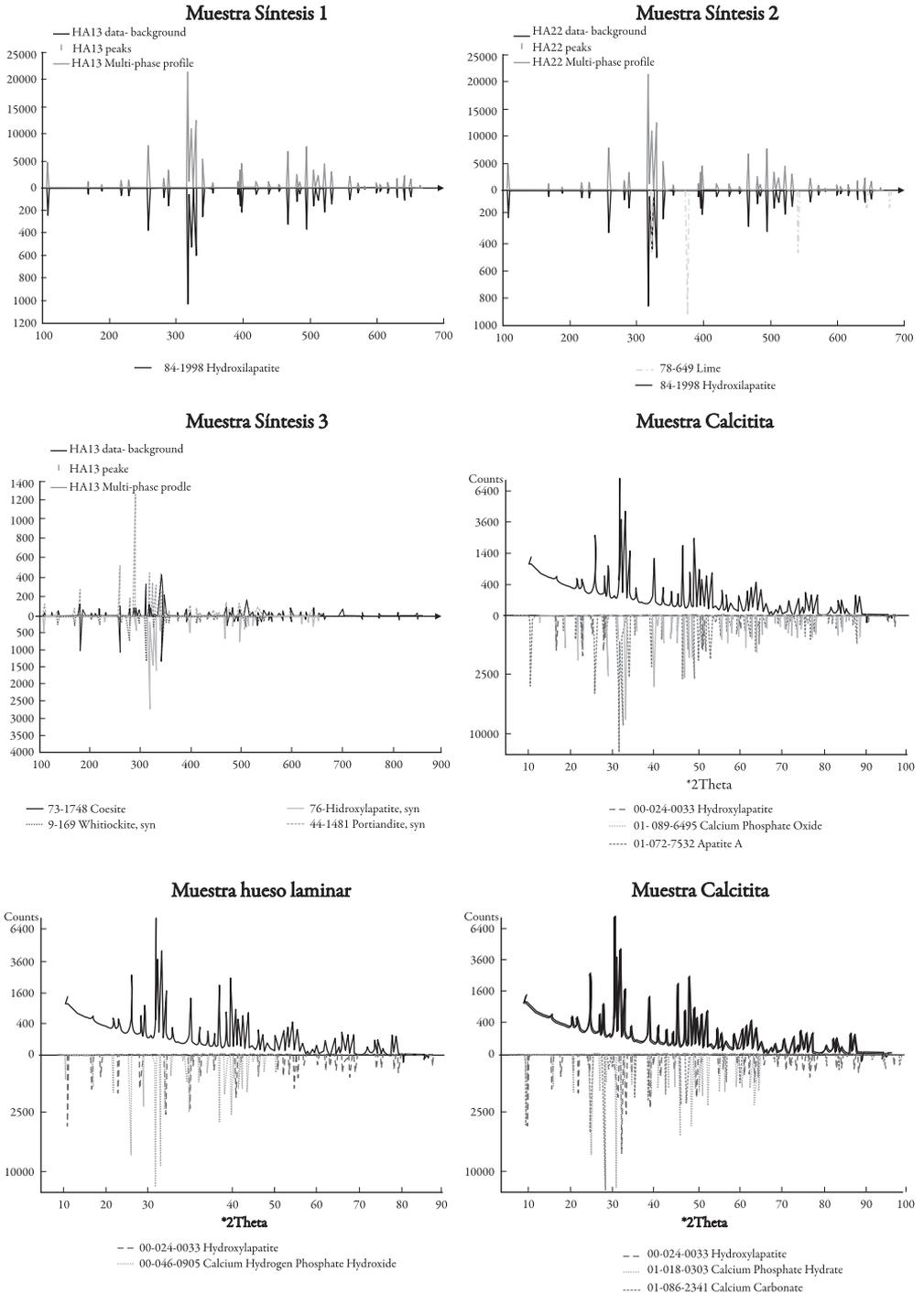


Figura 2. Difractogramas XRD de muestras de síntesis de HAp, hueso bovino y calcitita.

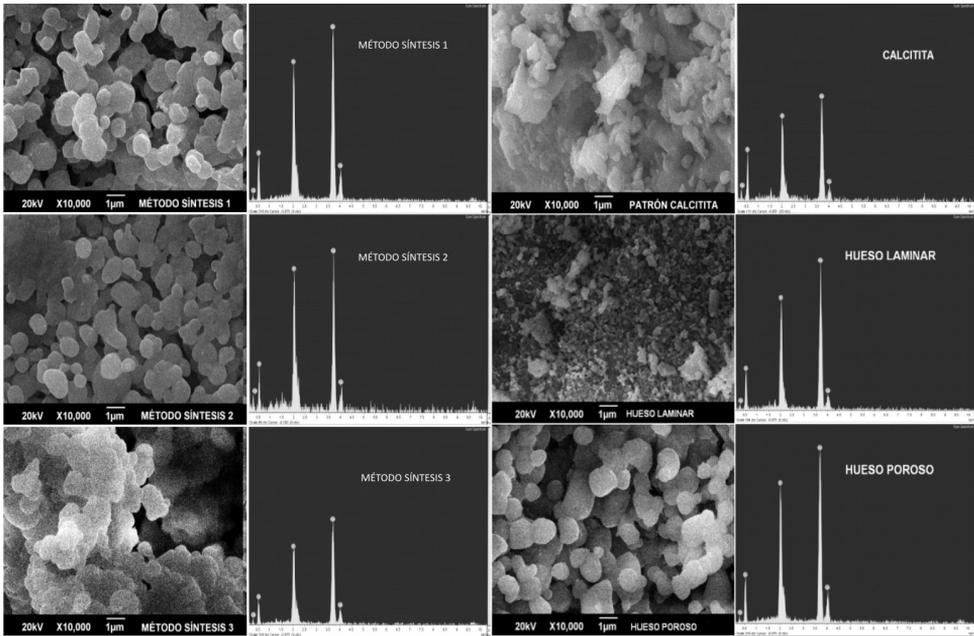


Figura 3. Imágenes SEM y EDX de muestras de HAp, hueso bovino y calcitita.

## CONCLUSIONES

El análisis de los tres métodos realizado en este trabajo muestra que la síntesis de HAp por precipitación ofrece mejores resultados comparados éstos con la muestra estándar comercial y el hueso bovino, ya que se obtuvo un tamaño de grano aproximado de  $1\ \mu\text{m}$ , relación molar Ca/P de 1,7, alta pureza y cristalinidad; mientras que los resultados obtenidos por vía sinterización muestran presencia de fases amorfas. No se encontraron diferencias entre la composición del hueso laminar y la composición del hueso poroso. Igualmente, la muestra patrón calcitita presentó similitud en su composición con las muestras del hueso bovino. Por último, el método de síntesis por precipitación por vía húmeda usando nitratos de calcio y fosfatos, es práctico y adecuado para realizar la inmovilización de HAp sobre un soporte metálico como silicio, con miras a su uso en cirugía reconstructiva en áreas médicas. Más estudios deben ser propuestos, en la búsqueda de materiales con propiedades y características necesarias, que permitan su utilización como andamiaje para el crecimiento de células productoras de tejido óseo con fines regenerativos. Los resultados de la síntesis de este material obtenidos en el presente estudio por diferentes métodos, nos permite seguir avanzando en esta búsqueda; pues a pesar de que se dispone de varios materiales que actúan como andamios, aún no

se ha descrito el que pueda sustituir al hueso autólogo corticoesponjoso o particulado. Es por esto por lo que es necesario seguir realizando investigaciones de nuevos materiales de alta resistencia, en el que el tamaño del poro mimetice la arquitectura del hueso trabecular y en el que la interconectividad de estos materiales permita que estos andamios sean impregnados con fases activas biológicas como factores de crecimiento. De esta manera, la combinación de materiales que logren crear el microambiente específico ideal para recibir células que produzcan tejido óseo, se presenta como una de las grandes perspectivas para obtener una rápida y aumentada regeneración tisular. Avances en este campo redundarán en beneficio de los pacientes que sufran de defectos óseos como osteoporosis y osteopenia, un desafío que se presenta para el futuro y que requiere, asimismo, el uso de diseños mediante la ingeniería de tejidos en 3D. Finalmente, el énfasis para la regeneración tisular también debe ser dado sobre mecanismos que produzcan autorreparación, como materiales bioactivos que estimulen genes que activen la diferenciación y proliferación de células osteoprogenitoras *in situ*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana, por el apoyo financiero (Proyecto 003263). Igualmente, agradecen a las Facultades de Ciencias Básicas y de Odontología de la Universidad Javeriana, por el apoyo logístico. Por último, nuestro sincero reconocimiento a la colaboración prestada por el Prof. Dr. César Augusto Sierra Ávila, director del Grupo de Macromoléculas, Departamento de Química, de la Universidad Nacional de Colombia; y por el Dr. Miguel Ángel Ramos García, coordinador del Laboratorio de Difracción y Fluorescencia de Rayos X, Unidad de Caracterización y Estructura de Materiales, Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas, Venezuela. Y a nuestros colaboradores Andrés Eduardo Ortiz Ardila y Carlos Enrique Parada Parra, miembros del Laboratorio de Absorción y Emisión Atómica, Departamento de Química de la Pontificia Universidad Javeriana.

## REFERENCIAS

1. J.G. Albarova, L. Garrido-Lahiguera, A. Salinasc, J. Román, A. Bueno-Lozano, R. Gil-Albarova, M. Vallet-Regi, The *in vivo* performance, *Biomaterials*, **25**, 4639 (2004).
2. M. Vallet-Regi, Revisiting ceramics or medical applications, *Dalton Trans.*, **44**, 5211 (2006).

3. J. He, M.C. Wang, Constitutive modelling of the densification and the grain growth of hydroxyapatite ceramics, *Biomaterials*, **26**, 1613 (2005).
4. R.W. Rice, The porosity dependence of physical properties of materials: A summary review, *Key. Eng. Mater.*, **115**, 1 (1996).
5. D. Shi, G. Jaing, X. Wen, "In vitro behavior of hydroxyapatite prepared by a depositon method", Processing and fabrication of advanced materials, VIII, eds. K. Khor *et al.*, World Scientific, Singapore, 2001, p. 117.
6. N. Kivrak, A.C. Tas, Synthesis of calcium hydroxyapatite-tricalcium phosphate composite bioceramic powders and their sintering behavior, *J. Am. Ceram. Soc.*, **81**, 2245 (1998).
7. P. Layrolle, A. Ito, T. Tateishi, Sol-gel synthesis of amorphous calcium phosphate and sintering into microporous hydroxyapatite bioceramics, *J. Am. Ceram. Soc.*, **81**, 1421 (1998).
8. A. Balamurugan, S. Kannan, S. Rajeswari, Bioactive sol-gel hydroxyapatite surface for biomedical application - *in vitro* study, *Trends Biomater. Artif. Organs*, **16**, 18 (2002).
9. M. Sivakumar, T.S.S. Kumar, K.L. Shantha, K.P. Rao, Development of hydroxyapatite derived from Indian coral, *Biomaterials*, **17**, 1709 (1996).
10. D. Tadic, M. Epple, Mechanically stable implants of synthetic bone mineral by cold isostatic pressing, *Biomaterials*, **24**, 4565 (2003).
11. W.M. Sigmund, N.S. Bell, L. Bergstrom, Novel powder-processing methods for advanced ceramics, *J. Am. Ceram. Soc.*, **7**, 1557 (2000).
12. M.H. Prado da Silva, A.F. Lemos, I.R. Gibson, J.M.F. Ferreira, J.D. Santos, Porous glass reinforced hydroxyapatite materials produced with different organic additives, *J. Non-Crystall Solids*, **304**, 286 (2002).
13. S. Madhavi, C. Ferraris, T.J. White, Synthesis and crystallization of macroporous hydroxyapatite, *J. Solid State Chem.*, **178**, 2838 (2005).
14. O. Lyckfeldt, J.M. Ferreira, Processing of porous ceramics by starch consolidation, *J. Eur. Ceram. Soc.*, **18**, 131 (1998).
15. K.S. Toohey, N.R. Sottos, J.A. Lewis, J.S. Moore, S.R. White, Self-healing materials with microvascular networks, *Nat. Mater.*, **7**, 56 (2007).

16. I. Mobasherpour, M.S. Heshajin, A. Kazemzadeha, M. Zakeri, Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method, *J. Alloys Comp.*, **430**, 330 (2007).
17. A. Wang, D. Liu, H. Yin, H. Wu, Y. Wada, M. Ren, T. Jiang, X. Cheng, Y. Xu, Size-controlled synthesis of hydroxyapatite nanorods by chemical precipitation in the presence of organic modifiers, *Mater. Sci. Engineer. C*, **27**, 865 (2007).
18. S. Pramanik, A.K. Agarwal, K.N. Rai, A. Garg, Development of high strength hydroxyapatite by solid-state-sintering process, *Ceram. Int.*, **33**, 419 (2007).
19. M. Markovic, B.O. Fowler, M.S. Tung, Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material, *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.*, **109**, 553 (2004).
20. J.A. Rivera, G. Fetter, L. Baños, J. Guzmán, P. Bosch, New hydroxyapatite-hydroxycalcite composites I. synthesis, *J. Porous Mater.*, **16**, 401 (2009).
21. S. Manafi, M.R. Rahimpour, Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite nanorods via hydrothermal conditions, *Chem. Eng. Technol.*, **34**, 972 (2011).
22. N.A.M. Barakat, M.S. Khila, A.M. Omrand, F.A. Sheikhd, H.Y. Kima, Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods, *J. Mater. Process. Technol.*, **209**, 3408 (2009).
23. C. García, C. Páucar, J. Gaviria. Study of some parameters that determine the synthesis of hydroxyapatite by the precipitation route. *Dyna Rev. Fac. Nac. Minas.*, **73**, 148 (2006).
24. C. Liu, Y. Huang, W. Shen, J. Cui, Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11, *Biomaterials*, **22**, 301 (2001).
25. S.H. Park, I.Y. Ryu, D.J. Kim, J.S. Han, M.H. Lee, Influence of hydrothermal reaction temperature and pH on phase stability of hydroxyapatite, *Key Engineer. Mater.*, **330**, 147 (2007).
26. L.T. Banga, K. Ishikawab, R. Othmana, Effect of silicon and heat-treatment temperature on the morphology and mechanical properties of silicon-substituted hydroxyapatite, *Ceram. Int.*, **37**, 3637 (2011).
27. M. Preto, A.L. Costa, E. Landi, A. Tampieri, C. Galassi, Dispersing behavior of hydroxyapatite powders produced by wet-chemical synthesis, *J. Am. Ceram. Soc.*, **86**, 1534 (2003).

28. S. Ramesh, C.Y. Tan, R. Tolouei, M. Amiriyan, J. Purbolaksono, I. Sopyan, W.D. Teng, Sintering behavior of hydroxyapatite prepared from different routes, *Materials & Design*, **34**, 148 (2012).
29. V.P. Orlovskii, V.S. Komlev, S.M. Barinov, Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics, *Neorganicheskie Materialy*, **38**, 1159 (2002).
30. S. Nath, K. Biswas, K. Wang, R.K. Bordia, B. Basuw, Sintering, phase stability, and properties of calcium phosphate-mullite composites, *J. Am. Ceram. Soc.*, **93**, 1639 (2010).
31. R.M. Silverstein, F.X. Webster, D.J. Kiemle, "Spectrometric identification of organic compounds", 7<sup>th</sup> edition, John Wiley & Sons, New York, 2005, 502 p.
32. B. Wopenka, J.D. Pasteris, A mineralogical perspective on the apatite in bone, *Mater. Sci. Engineer. C*, **25**, 131 (2005).
33. M.E. Bahrololoom, M. Javidi, S. Javadpour, J. Ma, Characterisation of natural hydroxyapatite extracted from bovine cortical bone ash, *J. Ceram. Process. Res.*, **10**, 129 (2009).
34. A. Ruksudjarit, K. Pengpat, G. Rujijanagul, T. Tunkasiri, Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite from natural bovine bone, *Curr. Appl. Phys.*, **8**, 270 (2008).
35. K. Donadel, M.C.M. Laranjeira, V.L. Goncalves, V.T. Fávere, J.C. de Lima, L.H.M. Prates, Hydroxyapatites produced by wet-chemical methods, *J. Am. Ceram. Soc.*, **88**, 2230 (2005).