

## **Síntesis y caracterización de hidroxiapatita microporosa, comparación con un producto comercial**

## **Synthesis and characterization of microporous hydroxyapatite, comparison with a commercial product**

*Nathalia Marín Pareja, Diana Marcela Escobar, Claudia Patricia Ossa\*, Alejandro Echavarría*

Grupo de Biomateriales, Bioingeniería, Universidad de Antioquia. A.A. 1226, Medellín, Colombia.

(Recibido el 25 de junio de 2007. Aceptado el 9 de noviembre de 2007)

### **Resumen**

La hidroxiapatita, componente natural del hueso, se puede ser obtener sintéticamente por la reacción entre el nitrato de calcio y el fosfato de amonio, conservando sus propiedades de osteoconductividad y su capacidad de unirse químicamente al tejido óseo. En este trabajo se obtuvo hidroxiapatita microporosa mediante la técnica de coprecipitación, adicionando un agente porogénico y con temperaturas de calcinado de 750 y 850 °C. La hidroxiapatita calcinada (denominada HA UdeA) se comparó con un producto comercial. Las muestras se caracterizaron usando las técnicas de difracción de rayos X (XRD), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), microscopía electrónica de barrido (SEM) y técnicas termoanalíticas (DTA y TGA). Los resultados indican que los productos HA UdeA y el producto comercial presentan características similares en estructura cristalina, composición química y adsorción de especies, y aunque las muestras evaluadas presentan diferencias morfológicas en geometría y tamaño de partícula, ambos cerámicos se pueden utilizar como biomaterial en implantes, por ejemplo para rellenos óseos.

----- **Palabras clave:** hidroxiapatita, porosidad, relleno óseo, fosfatos de calcio, osteointegración.

---

\* Autor de correspondencia: teléfono: + 57 + 4 +219 55 65, fax: + 57 + 4 + 211 90 28, correo electrónico cpossa@udea.edu.co (C.P.O. Ossa).

### **Abstract**

The hydroxyapatite is the natural component of the human bone which can synthetically obtained by the reaction between calcium nitrate and ammonium phosphate keeping its bioactivity properties. Therefore, it can be chemically linked with the bone tissue. In this work microporous hydroxyapatite was obtained by a precipitation method, a polymer was added to generate the porosity and calcined at 750 and 850 °C. The synthesized hydroxyapatite (denominated HA UdeA) was compared with a commercial product. The samples were characterized by X Ray Diffraction (XRD), Fourier Transformed Infra Red (FTIR), Scanning Electronic Microscopy (SEM) and Thermoanalytical techniques (DTA – TGA). The results indicate that HA UdeA and the commercial product presented similar characteristics as crystalline structure, chemical composition and adsorption of species. Although some differences in shape and particle size were observed both ceramics can be used as implant biomaterials, for example in bone repair.

----- *Keywords:* hydroxyapatite, porosity, bone repair, calcium phosphate, oseointegration

## Introducción

El hueso tiene notable potencial regenerativo durante la reparación de fracturas y defectos esqueléticos, razón por la cual, en cirugía ortopédica y maxilofacial un injerto de hueso ayuda a completar la cicatrización ósea en la reparación de las deformidades. Para tal efecto, un injerto de hueso autólogo es el material óptimo, sin embargo su uso es problemático debido a la morbilidad del sitio donador, cantidades insuficientes de material y la reabsorción incontrolada. Por tal motivo, se han buscado alternativas a este tipo de injertos, que incluyen cerámicas tipo fosfato de calcio [1].

El tejido óseo de los animales vertebrados y del hombre está formado por 65% de fase inorgánica, la cual se asemeja a la estructura de la hidroxiapatita (HA), que es un biocerámico con la capacidad de unirse químicamente con el tejido óseo, haciéndola bioactiva. Su similitud con el hueso, ha permitido que se convierta en una alternativa como sustituto óseo en diferentes tratamientos médicos, en especial en la cirugía maxilofacial [2]; siendo tema de variadas investigaciones [3-4]. Entre sus propiedades se incluyen cristalinidad, pureza, densidad, morfología, porosidad y microestructura, características apropiadas y necesarias para aplicaciones biomédicas. La HA sintética se puede encontrar comercialmente en sus formas bioreabsorbible (Osteogen® – Implant, NY) o no reabsorbible (Calcite® - Sulzer Medica Sulzer Calcitek, NY), siendo su uso dependiente de las características deseadas para la implantación. En el caso del Osteogen®, se desea que el producto sea reabsorbido y redepositado como hueso nuevo, por lo que se utiliza para el relleno de cavidades óseas con miras a insertar posteriormente un implante metálico, mientras que el Calcite® se coloca en la mandíbula con la finalidad de aumentar el reborde alveolar sin que éste sea absorbido.

Las mezclas de hidroxiapatita (HA) y fosfato tricálcico (βTCP) son las más usadas para rellenar y reemplazar hueso en implantes dentales, transportar productos orgánicos y como recubrimiento

para implantes dentales [5]. El principal objetivo de este estudio es desarrollar una hidroxiapatita hipoestequiométrica, denominada HA UdeA, la cual, al calcinarla a 750 y 850 °C adquiere características de reabsorción. El material obtenido se compara con un producto comercial en cuanto a cristalinidad, porosidad y morfología, con miras a contribuir a la solución del problema social, que permita la consecución de un material de implante biocompatible, de fabricación nacional y a bajo costo.

## Materiales y métodos

Se partió de soluciones acuosas de nitrato de calcio tetrahidratado y fosfato de amonio ajustando a pH básico con amoníaco. Todos los reactivos son de grado analítico. Las soluciones obtenidas se mezclaron en cantidades tales que permitieron obtener una hidroxiapatita hipoestequiométrica, y fueron mantenidas bajo agitación constante por 24 horas. Una vez completada la reacción se realizaron varios lavados con agua destilada, eliminando así el nitrato de amonio formado como subproducto. Posteriormente se adicionó el agente porogénico para generar un tamaño de poro adecuado, el cual se volatiliza durante el tratamiento térmico, proporcionando los espacios tubulares que ayudan a la vascularización del implante [6]. El secado del precipitado obtenido se realizó en una estufa a 120 °C durante 4 horas, tiempo durante el cual se elimina la mayor cantidad de agua posible. Una fracción de la hidroxiapatita obtenida se calcinó a 1.050 °C para evaluar la cristalinidad. Una vez corroborada dicha cristalinidad, se realizaron calcinaciones a 750 y 850 °C por 2 horas para obtener la HA deseada.

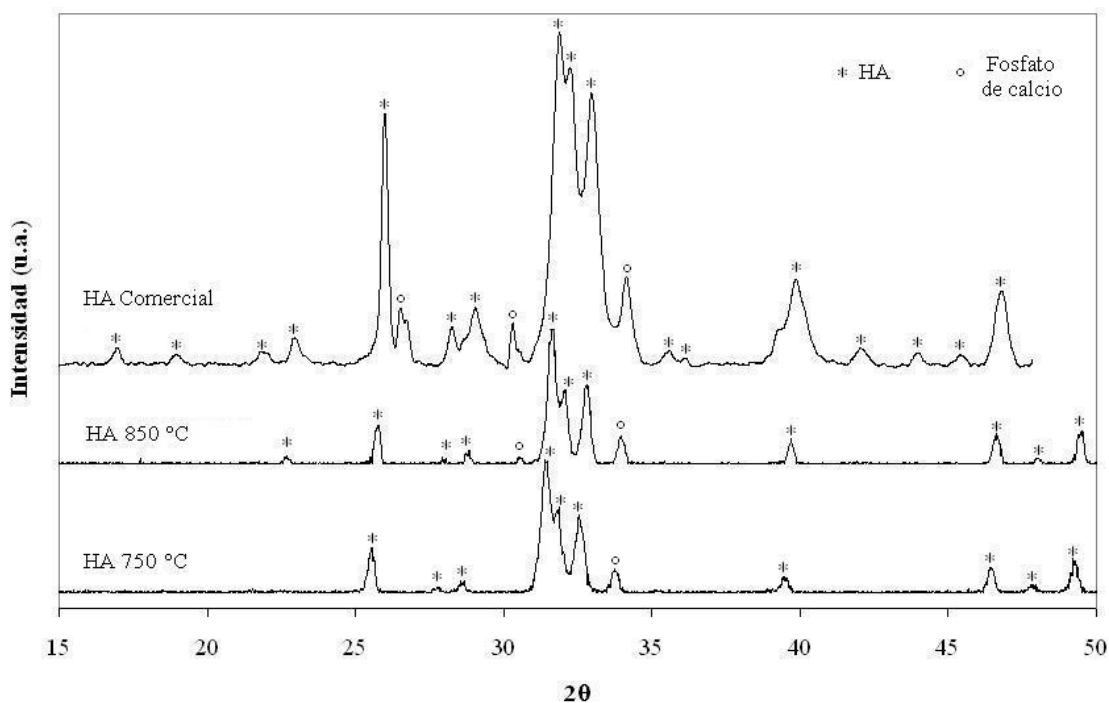
El polvo de HA (HA UdeA) y el producto comercial se caracterizaron por difracción de rayos X (XRD), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis térmico diferencial (DTA). Las fases presentes en las hidroxiapatitas comparadas, se analizaron en un difractómetro marca Siemens D 501 con radiación de ánodo de cobre monocromado, con filtro de níquel y detector proporcional ( $\text{CuK}_\alpha$ ,  $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ). Los

difractogramas se obtuvieron en un rango de  $2\theta$  variando entre  $15$  y  $70^\circ$ , con un paso de  $0,08^\circ$  y un tiempo de  $2$  s por paso. Las evaluaciones de los grupos funcionales se realizaron usando un espectrómetro de infrarrojo MATTSON 5000 en un espectro fundamental entre  $450$  y  $4.000\text{ cm}^{-1}$  utilizando una pastilla de bromuro de potasio (KBr). La morfología de las partículas se evaluó usando un microscopio electrónico de barrido marca JEOL JSM-590LV. Las partículas fueron recubiertas con oro para asegurar la conductividad de las muestras. La estabilidad térmica de la HA UdeA y del producto comercial, se compara-

ron usando análisis térmico diferencial (DTA) y termogravimetría (TGA) en el equipo Universal V3 OG Instruments. El polvo se examinó en atmósfera de aire, monitoreando la pérdida de peso y el comportamiento térmico de las muestras a una tasa de calentamiento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ .

## Resultados y discusión

En la figura 1, pueden observarse los difractogramas de las muestras del producto comercial y de la HA producida en la Universidad de Antioquia.



**Figura 1** Difractogramas comparativos del producto comercial y de la hidroxiapatita UdeA

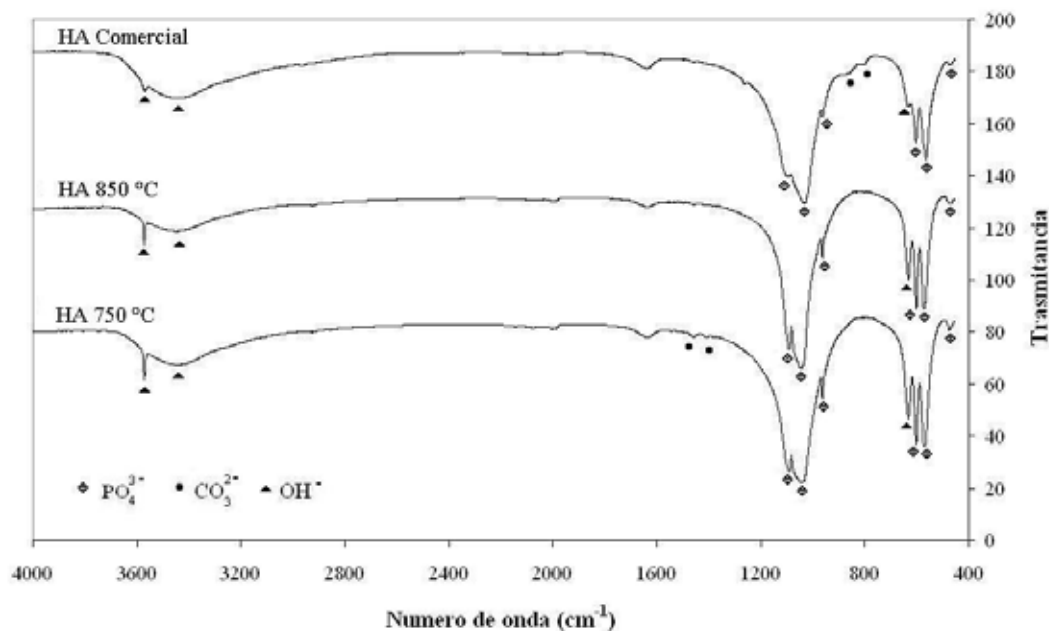
En la figura 1 se observa el pico principal de la hidroxiapatita, con la mayor intensidad a  $2\theta = 31,5$  correspondiente al plano (211), acompañado por dos de menor intensidad a  $2\theta = 32$  y  $2\theta = 33$  correspondientes a los planos (112) y (300) respectivamente y algunos picos secundarios a  $2\theta = 25,5$  correspondiente al plano (002),  $2\theta = 34$  correspondiente al plano (202),  $2\theta = 39,5$  correspondiente al plano (310),  $2\theta = 41,5$  correspondiente al plano

(222) y  $2\theta = 49$  correspondiente al plano (213); caracterizando este fosfato como una hidroxiapatita pura. Se observa la presencia de un pico a  $2\theta = 30,8$  y picos a  $2\theta = 27,6$  y  $2\theta = 34$  de menor intensidad, evidenciando la presencia de otro fosfato de calcio. El incremento de la temperatura de  $750$  a  $850^\circ\text{C}$  muestra el aumento de la cristalinidad, esto puede ser asociado al transporte de masa debido a la coalescencia de los granos [7].

Los resultados de la composición química por análisis EDS (no mostrados), realizados sobre diferentes granos de las muestras de la HA UdeA calcinadas a 750 y a 850 °C, además del producto comercial muestran la presencia Ca, P y O, principales componentes de la HA. También muestran la presencia de C, que puede sugerir la

presencia de carbonatos en la muestra, posiblemente debido a la absorción física a partir de la atmósfera [6].

Los resultados FTIR de las muestras de la HA UdeA y del producto comercial se muestran en la figura 2.



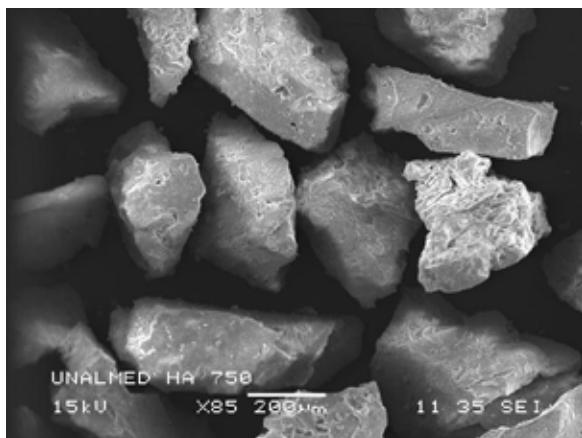
**Figura 2** Espectros FTIR comparativos del producto comercial y de la hidroxiapatita UdeA

Una HA típica muestra bandas para un espectro FTIR en 3.600, 3.569, 3.578, 3.448 y 633  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a grupos OH, bandas en 474, 571, 601, 692, 1.032, 1.040,  $\approx 1.087$ , 1.092  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  y bandas entre 870, 1.420 y 1.480  $\text{cm}^{-1}$  si la muestra contiene grupo  $\text{CO}_3^{2-}$  [8]. De estos picos principales la muestra calcinada a 750 °C presenta bandas a 473, 570, 601, 632, 962, 1.043, 1.090, 3.471 y 3.571  $\text{cm}^{-1}$ ; la muestra calcinada a 850 °C presenta bandas a 474, 572, 601, 632, 962, 1.044, 1.089, 3.449 y 3.572  $\text{cm}^{-1}$ . El producto comercial presenta bandas a 473, 563, 602, 631, 869, 961, 1.031, 1.093, 3.447 y 3.570  $\text{cm}^{-1}$ , lo cual significa que el producto comercial es tipo hidroxiapatita amorfa.

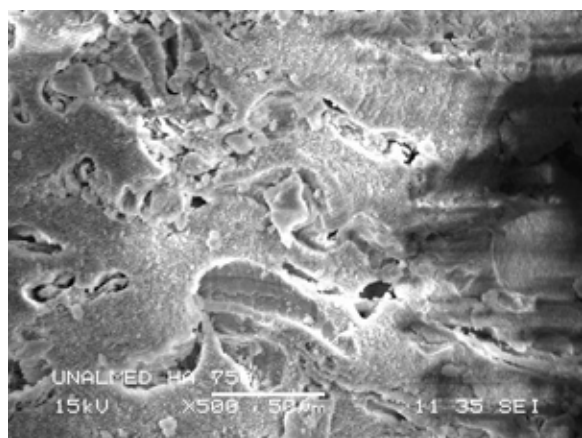
En la figura 2 se observan dos bandas a 1.456 y 1.409 pertenecientes al grupo  $\text{CO}_3^{2-}$ . Los cuales desaparecen al calentar la muestra a 850 °C, indicando una posible descarboxilación de la HA, liberando  $\text{CO}_2(\text{g})$  [7]. Se puede observar que para el producto comercial no aparecen estas bandas. En todas las muestras se encuentran trazas de agua y se observan también carbonatos. La presencia de estos puede deberse a la absorción física a partir de la atmósfera [6].

En las figura 3 a 5 se muestran los resultados obtenidos por microscopía electrónica de barrido para las muestras del producto comercial y de la HA UdeA calcinada a 750 y 850 °C.

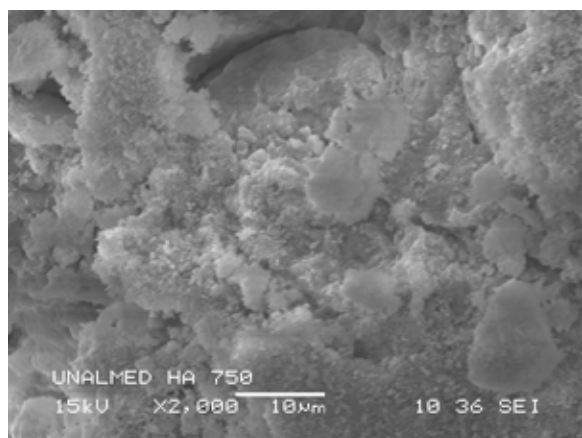
(a)



(b)



(c)



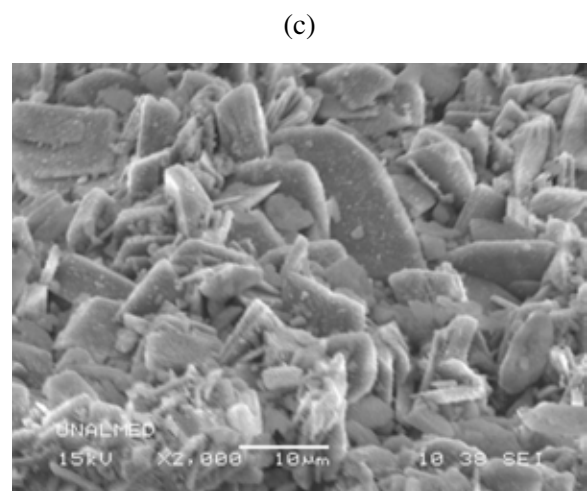
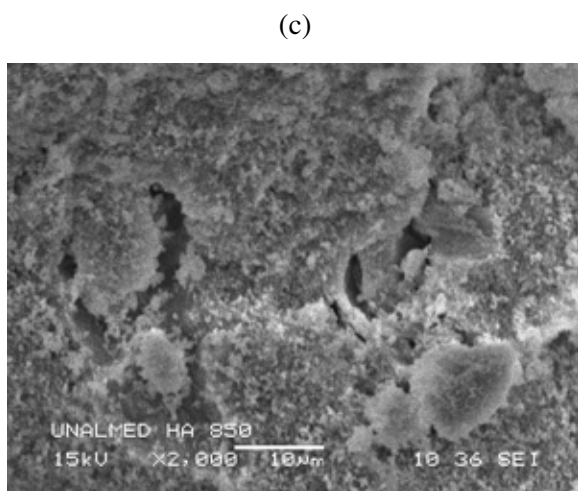
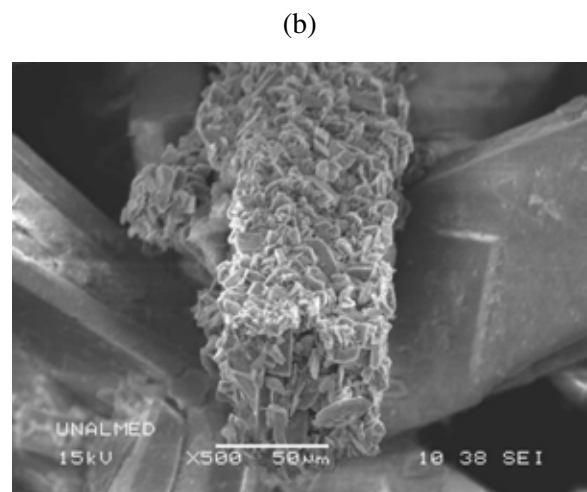
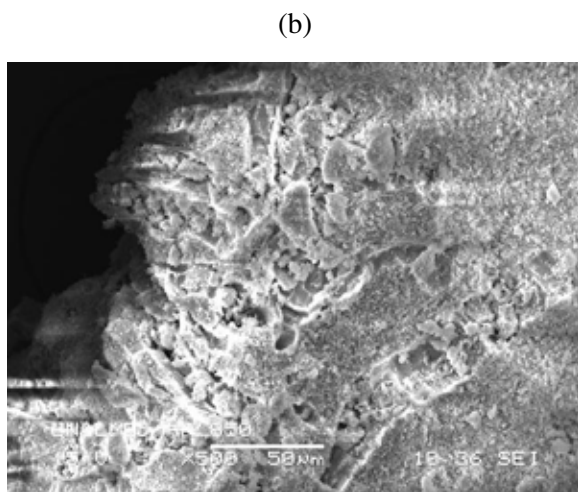
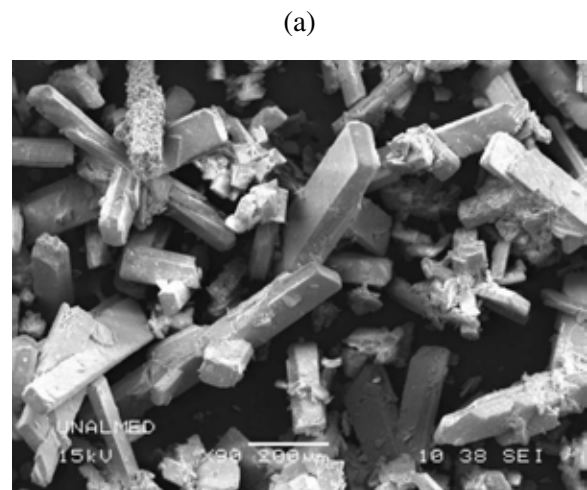
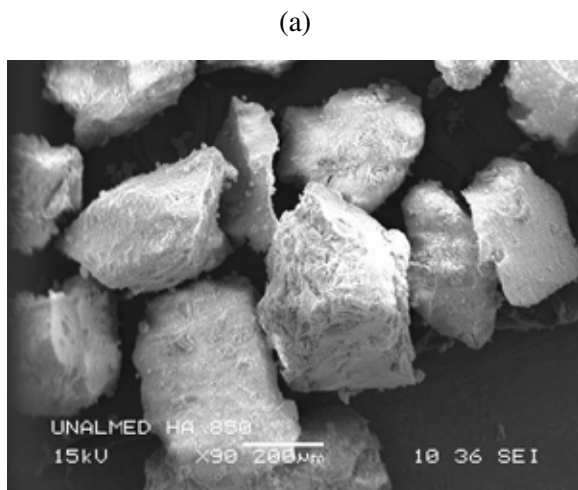
**Figura 3 a, b y c.** Micrografías de la hidroxiapatita UdeA a 750 °C (SEM)

En la figura 3a se muestra la HA UdeA calcinada a 750 °C a 85 aumentos, se observan granos de geometría irregular, de diferentes tamaños y muy angulosos, con diferente grado de porosidad, mientras que a 500 y 2.000 aumentos (figuras 3b y 3c) se revela una superficie porosa, rugosa y sin geometría definida. Los poros presentes en las partículas tienen diferentes tamaños y están distribuidos de manera arbitraria. Esto se puede atribuir al tamaño inadecuado del agente porogénico, lo cual a su vez influyó en la diferencia en la velocidad de precipitación, entre este y la hidroxiapatita, cuando estaban juntos en solución acuosa.

En la figura 4 se muestran las micrografías de la muestra de HA UdeA calcinada a 850 °C, a bajos aumentos (figura 4a), se observa que la superficie de cada grano es más áspera que la de la HA UdeA calcinada a 750 °C, pero se conserva la granulometría. Al realizar un mayor aumento (2.000x) a una de las partículas se observa apilamiento de pequeñas partículas en la superficie (figura 4c).

Al comparar las muestras de la HA UdeA calcinadas a diferentes temperaturas (figuras 3 y 4), se puede observar que las características granulométricas son muy similares, de lo que se concluye que la forma de las partículas no cambió con el tratamiento térmico. Las partículas presentan una superficie rugosa, característica importante para aumentar la adhesión celular [9], se puede entonces concluir que el producto HA UdeA calcinado a 750 °C, cumple con este requisito y por lo tanto sería un buen material de implante.

La muestra del producto comercial presenta una morfología de gránulos alargados (figura 5) y más pequeños que los de la HA UdeA. También se puede ver que estos granos forman aglomerados. Las partículas de los dos productos comparados tienen geometrías diferentes lo que puede influir en la respuesta final al momento de la implantación. Las partículas del producto comercial, a pesar de quedar retenidas en el tamiz de 250 µm, tienen un tamaño menor que la HA UdeA. Estas partículas quedan retenidas en este tamiz debido a su geometría alargada y a la aglomeración de partículas. La unión de las partículas se debe posiblemente a las fuerzas de la superficie de corto alcance.



**Figura 4 a, b, c.** Micrografías de la hidroxiapatita UdeA a 850 °C (SEM)

**Figura 5 a, b, c.** Micrografías del producto comercial (SEM)

Según lo observado en los resultados de SEM se puede concluir que el producto institucional HA UdeA y el producto comercial tienen diferente morfología. Meejoo [7] reportó que pequeñas diferencias en la estequiometría, la cristalinidad o la morfología podrían contribuir a la diferencia en los comportamientos químicos o clínicos del compuesto de fosfato de calcio.

En las imágenes se observó que los poros tenían forma irregular, con tamaños desde 4 a 14 µm y algunas regiones cavernosas de hasta 50 µm, que pueden ser debidos a la aglomeración de agente porogénico en el proceso de coprecipitación de la muestra; la superficie de los poros en la HA sintetizada tiene alta rugosidad. Se ha encontrado que cuando los fosfatos de calcio son porosos ofrecen una química de superficie que conduce a la nueva formación del hueso [10]. Surge el cuestionamiento de ¿cuál es el tamaño apropiado de poro que permite el crecimiento del tejido? En la literatura existe una diversidad de conceptos. Según lo reportado por algunos autores los poros deben tener mínimo 50 µm [11], mientras que otros reportan que deben estar entre 250-300 µm [12]. Sinha y colaboradores [13] realizaron una clasificación de la reacción del tejido según el tamaño del poro del material implantado, así: Poros menores de 10 µm evitan el ingreso de células, poros entre 10 y 50 µm permiten la penetración de tejido fibrovascular, poros entre 50 y 150 µm permiten la penetración ósea y poros mayores de 150 µm permiten la penetración y la formación ósea. Además, la penetración de tejido óseo sólo es posible si los poros se encuentran interconectados, pero si son ciegos esto no es posible.

Según las micrografías obtenidas por microscopía electrónica los poros de las partículas de la HA UdeA tienen en máximo 50 µm, este tamaño puede no asegurar la vascularización y crecimiento del tejido en su interior. Sin embargo, lograrán un aumento de rugosidad en la superficie, lo que beneficiará los procesos de adhesión celular. Además no se puede dejar de lado las grandes propiedades de osteoconductividad y bioactividad de la hidroxiapatita, la cual por sí misma se une químicamente con el tejido óseo.

Los resultados obtenidos para determinar la estabilidad térmica de las muestras HA UdeA 750 °C, HA UdeA 850 °C y del producto comercial se muestran en las figuras 6, 7 y 8 respectivamente. El peso total perdido para cada una de las muestras fue de 1,8% para la HA sintetizada a 750 °C (figura 6), 1,4% para la HA sinterizada a 850 °C (figura 7) y de 1,75% para el producto comercial (figura 8). Este cambio de masa podría atribuirse a la desaparición parcial física y química de agua absorbida o posiblemente agua de la estructura cristalina [7].

Según datos reportados por otros investigadores sobre curvas DTA para hidroxiapatita [14], los picos de DTA que aparecen entre 50 y 600 °C corresponden a la pérdida de agua adsorbida, los picos entre 600 y 800 °C, corresponden al descargo de residuos de la síntesis.

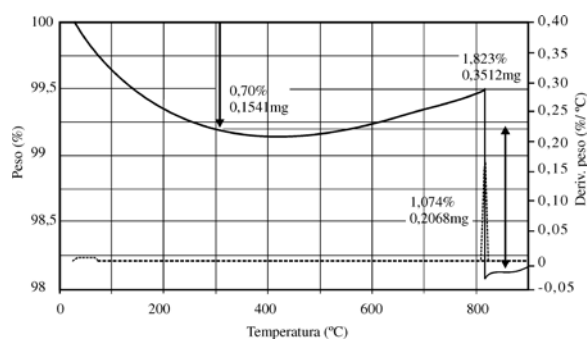


Figura 6 Análisis térmico diferencial y termogravimétrico para la hidroxiapatita UdeA a 750 °C

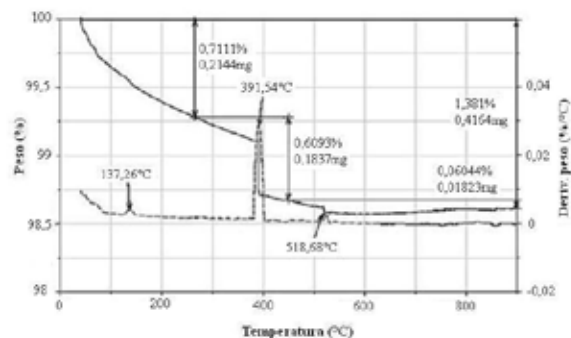
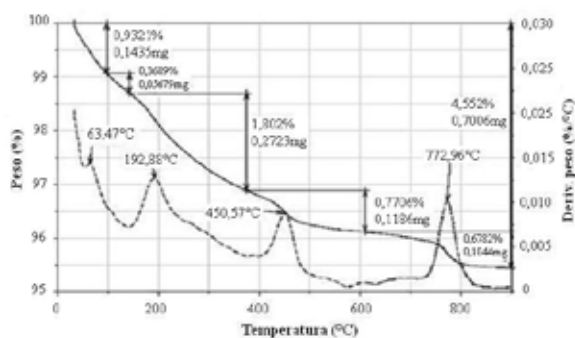


Figura 7 Análisis térmico diferencial y termogravimétrico para la hidroxiapatita UdeA a 850 °C



La HA UdeA calcinada a 750 °C muestra estabilidad hasta una temperatura de 825 °C donde sufre una reacción, posiblemente hubo desaparición de moléculas de agua o comenzó el proceso de formación de otro fosfato de calcio, que como se muestra en los análisis de XRD, no aparece hasta los 850 °C. La muestra de HA UdeA sintetizada a 850 °C, presenta picos en 137,26, 391,54 y 518,68 °C. Estas variaciones en la energía de la muestra se pueden atribuir a la liberación del agua que contiene el material. A temperaturas superiores a 518,68 °C, la muestra presenta estabilidad térmica, puesto que la transformación de la HA a TCP, sucedió con el tratamiento térmico a 850 °C realizado en un proceso anterior al ensayo de análisis térmico.

En las curvas obtenidas por DTA y TGA para el producto comercial se observan picos en 63,47, 192,88, 450,57, 772,96 °C, indicando que el material no es estable por lo menos hasta una temperatura de aproximadamente 800 °C. Estos picos pueden atribuirse a la desaparición parcial física y química de agua absorbida [7].



**Figura 8** Análisis térmico diferencial y termogravimétrico para el producto comercial

### Conclusiones

La morfología de los materiales comparados HA UdeA y el producto comercial es diferente. La HA UdeA presenta partículas angulosas y porosas, mientras que en el producto comercial presenta forma alargada de sección rectangular.

Las diferentes geometrías pueden influir en la respuesta final al momento de la implantación.

Siendo la rugosidad un factor importante para aumentar la adhesión celular, se puede entonces concluir que la HA UdeA cumple con este requisito y por lo tanto sería un buen material de implante.

Las muestras de HA UdeA y el producto comercial presentaron un comportamiento similar en cuanto a estabilidad térmica, pues con el aumento de temperatura condujo a la desaparición parcial física y química de las moléculas de agua.

Los productos HA UdeA y el producto comercial presentaron características similares en cuanto a estructura cristalina, composición química y adsorción de especies, mientras que presentan diferencias en cuanto a forma y tamaño de la partícula. Sin embargo, ambos materiales pueden ser usados en implantes, por ejemplo como material de relleno óseo. Para confirmar esta hipótesis se están desarrollando ensayos in vitro e in vivo con el material obtenido HA UdeA.

### Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al Comité para el Desarrollo de la Investigación – CODI – de la Universidad de Antioquia por la financiación del proyecto y al profesor Carlos David Jaramillo de Medicina Veterinaria, participante del proyecto de investigación.

### Referencias Bibliográficas

1. R. Schnettler, V. Alt, E. Dingeldein, H. Pfefferle, O. Kilian, Ch. Meyer, Ch. Heiss, S. Wenisch. "Bone ingrowth in bFGF-coated hydroxyapatite ceramic implants". *Biomaterials*. Vol. 24. 2003. pp. 4603-4608.
2. U. Gburecka, O. Grolmsa, J. Barraletb, L. Groverb, R. Thulla. "Mechanical activation and cement formation of b-tricalcium phosphate". *Biomaterials*. Vol. 24. 2003. pp. 4123-4131.
3. Z. Zyman, V. Glushko. "Nonstoichiometric hydroxyapatite granules for orthopedic applications". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. Vol. 15. 2004. pp. 551-558.

4. J. Tian, J. Tian. "Preparation of porous hydroxyapatite". *Journal of Materials Science*. Vol. 36. 2001. pp. 3061-3066.
5. R. Legeros, S. Lin, R. Rohanzadeh, D. Mijares, J. Legeros. "Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications". *Journal of materials science: Materials in Medicine*. Vol. 14. 2003. pp. 201-209.
6. A. Echavarría, C. Riaño, A. Noreña. "Hidroxiapatita sintética de porosidad inducida: Comparación con el hueso calcinado". *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*. Vol. 19. 1999. pp. 56-64.
7. S. Meejoo, W. Maneepprakorn, P. Winotai. "Phase and thermal stability of nanocrystalline hydroxyapatite prepared via microwave heating". *Thermochemical Acta*. Vol. 447. 2006. pp. 115-120.
8. M. Londoño. *Influencia del tratamiento térmico en las propiedades cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética*. Trabajo de grado de Maestría. Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín. Colombia. 2005.
9. M. Yoshimoto. *Estudo da biocompatibilidade de diferentes revestimentos de implantes de titânio empregando microscopia de luz em coelho*. Trabajo de grado de Maestría. Universidad de São Paulo, São Paulo. Brasil. 2000.
10. M. López, A. Echavarría, R. Suárez, N. Herrera. *Hidroxiapatita macroporosa obtenida en la Universidad de Antioquia: Síntesis, caracterización y comparación con el hueso esponjoso y calcinado de bovino*. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*. Vol. 30. 2003. pp. 109-124.
11. L. Sun, C. Berndt, K. Gross, A. Kucuk. "Materials fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review". *Journal of Biomedical Materials Research: Application Biomaterials*. Vol. 58. 2001. pp. 570-592.
12. N. Engin, A. Tas. "Manufacture of macroporous calcium hydroxyapatite bioceramics". *Journal of the European Ceramic Society*. Vol. 19. 1999. pp. 2569-2572.
13. M. Sinha. D. Basu. P. Sen. "Poruos hydroxyapatite ceramic and its clinical applications". *Interceramic*. Vol. 49. 2000. pp. 102-105.
14. D. Marchat, D. Bernache-Assollant, E. Champion. "Cadmium fixation by synthetic hydroxyapatite in aqueous solution--thermal behaviour". *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 139. 2007. pp. 453-460.