

# Síntesis y Análisis de Hidroxiapatita

Martha Dorelly Rodríguez B.<sup>1</sup>

## RESUMEN

Se realiza un estudio sobre hidroxiapatita ceramizada, sintetizada en Colombia, para valorar sus propiedades fisicoquímicas, comparándola con dos productos norteamericanos, según normas de la USP en relación con la proporción cuantitativa de Ca/P, estructura mediante espectroscopía infrarroja, textura mediante microscopía electrónica de barrido, estabilidad y determinación de impurezas, encontrándose que el producto en estudio posee propiedades equivalentes con los productos de control.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos decenios se han empleado diferentes biomateriales como vidrio alumina, polietileno y cerámicas de fosfato de calcio para la reconstrucción de defectos óseos. Entre éstos la hidroxiapatita, HA, ha presentado resultados satisfactorios como material de implante óseo; sus principales ventajas son las excelentes biocompatibilidad y bioactividad.

Las propiedades fisicoquímicas de la hidroxiapatita, como su composición, estructura y textura, determinan su biorresorción.

En el método de síntesis presentado a continuación se obtiene una HA pura, estequiométrica, estructural y superficialmente similar a la parte mineralizada del tejido óseo. La HA se ha diseñado para permitir fibrovascularización cuando se implanta.

El uso clínico de la HA consiste en la aplicación sola o en combinación con hueso para reconstrucción de defectos óseos craneomaxilofaciales; como implante intraorbitario en oftalmología y para el recubrimiento de prótesis o implantes de oseointegración.

## I. MATERIALES Y MÉTODOS ANALÍTICOS.

Se estudia HA sintetizada, material ceramizado, en gránulos de tamaño de partícula aproximado malla 20-40<sup>2</sup>

Grupo de Control:

HA, no reabsorbible en gránulos malla 20-40, norteamericana<sup>3</sup>

### A. DETERMINACIÓN QUÍMICA CUANTITATIVA DE CALCIO Y FÓSFORO

La determinación de Calcio, Ca, se realiza por el método de titulación con EDTA [2].

La determinación de Fósforo, P, se realiza por espectrofotometría UV, con la técnica de reducción con ácido ascórbico según Murphy y Riley [9].

Se toman cinco muestras al azar de cada síntesis, y se adecuan según se estipula en la USP XXIII [11], se valoran contenidos de Ca y P y se calculan las relaciones molares Ca/P respectivas.

### B. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.

Los espectros IR de las muestras dispersadas en KBr (1mg/300 tableta), se obtuvieron en la región del espectro entre 4.000 y 250 cm<sup>-1</sup>, usando un espectrofotómetro Pelkin Elmer 1750 IR-FT y 467 IR-FT.

### C. DIFRACCIÓN RAYOS X.

Los difractogramas se tomaron en difractor Philips, utilizando cobre, y con un barrido entre cero y 70 grados.

### D. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO(SEM)

El análisis de estructura superficial se realiza mediante ampliación con microscopía electrónica de barrido.

<sup>1</sup> Química Farmacéutica, Universidad Nacional de Colombia

<sup>2</sup> Colombia IMPLASTIC - HA, Madrob Farmacéutica

<sup>3</sup> HA 1: Orthomatrix, USA; HA 2: Calcitite, Calcitek, USA

Para observación al microscopio electrónico se recubren con una película de oro por el método de pulverización catódica al vacío. Se colocan las muestras en una cámara de vacío que se lleva a 0,3 Torr y se establece una diferencia de potencial de 1.600V entre el ánodo de oro y la muestra durante un tiempo de un minuto, a 15 mA. Se toman microfotografías con aumento 260x 1360x y 341x a 30 KV de energía del haz de electrones.

#### E. PRUEBAS LÍMITES OFICIALES USP XXIII PARA LA DETERMINACIÓN DE IMPUREZAS.

Según la metodología oficial descrita en la USP XXIII [11,12] se cuantifica la presencia de As, metales pesados, pérdida por ignición, sustancias insolubles en ácido, sustancias solubles en agua, carbonato, cloruro, sulfato, nitrato, Bario, sal dibásica y óxido de calcio.

#### F. ENSAYO DE ESTABILIDAD ACELERADA.

Se aplicó el test de disolución USP XXIII [11] para tabletas, dentro de las siguientes condiciones:

Medio: Buffer pH 6,5

Volumen del medio: 100ml

rpm: 50

Equipo: Sistema para test de disolución oficial USP XXIII con paletas.

Cantidad de granulado por vaso: 1 gramo exactamente pesado.

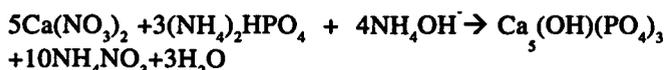
Temperatura: 37 °C

Número de muestras: seis para cada material.

Tiempo: 10 meses. Al cabo de éste tiempo se analizó el contenido de Ca disuelto por precipitación de oxalato de calcio, método USP XXIII.

## II. SÍNTESIS QUÍMICA.

El procedimiento se basa en la reacción de precipitación en agua de sales de calcio y de fósforo en medio alcalino según la ecuación:



que es el método más respaldado para producir HA hasta el momento [1].

- Se emplean soluciones 0,5M de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y 0,3M de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ajustadas respectivamente a pH entre 11

y 12 con amoniaco.

- Todos los reactivos son reactivos analíticos Merck y el agua destilada libre de  $\text{CO}_2$ .
- El reactivo limitante es el nitrato de calcio.
- El procedimiento sigue las etapas planteadas por Hayek y Jarcho [1,6]: precipitación con agitación fuerte y a temperatura ambiente, centrifugación, filtración, secado y sinterización.

Con el objetivo de obtener una HA estequiométrica con las mejores propiedades fisicoquímicas en cuanto a composición, estructura y textura para su óptimo desempeño como material de implante óseo, se han introducido dos modificaciones a los métodos descritos que son: 1) Forma y velocidad de adición de las soluciones de calcio y de fósforo y 2) La atmósfera presente.

Fijando las condiciones del proceso de síntesis se realizan cinco experimentos de obtención de HA de acuerdo con el siguiente procedimiento [10]:

La precipitación se efectúa en un reactor de vidrio de dos bocas adaptadas para cargar las soluciones previamente estandarizadas de calcio y de fósforo. El reactor contiene agua ajustada a pH a 11-12 con amoniaco, en agitación magnética. En éstas condiciones se inicia la adición simultánea de las soluciones reactantes. Todo el sistema de síntesis debe estar aislado dentro de una cámara de atmósfera controlada saturada con gas nitrógeno. Las demás etapas del proceso de síntesis siguen lo descrito en el método referenciado.

## III. RESULTADOS.

### A.COMPOSICIÓN.

La forma y la velocidad de adición de las soluciones de calcio y de fósforo, influyen en la relación molar Ca/P de la HA, véase en el cuadro 1.

CUADRO 1. CONDICIONES FIJADAS EN CADA EXPERIMENTO DE SÍNTESIS PARA OBTENER HIDROXIAPATITA

Síntesis	1	2	3	4	5
Concentración de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,500	0,386	0,643	0,500	0,500
Concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,282	0,210	0,207	0,282	0,282
Velocidad de adición de los reactivos	2,2	3,0	4,0	12,0	12,0
Saturación de Ca, ml /min. <sup>1</sup>	2,2	3,0	3,5	12,0	12,0
Saturación de Fosfato, (ml /min)					
Sinterización °C/ 1 hora	800	1.100	1.100	1.100	1.100
Atmósfera	N <sub>2</sub> (g)	Normal	Normal	N <sub>2</sub> (g)	N <sub>2</sub> (g)
Relación Ca/P	1,54±0,18	1,58±0,02	1,66±0,02	1,67±0,01	1,67±0,01

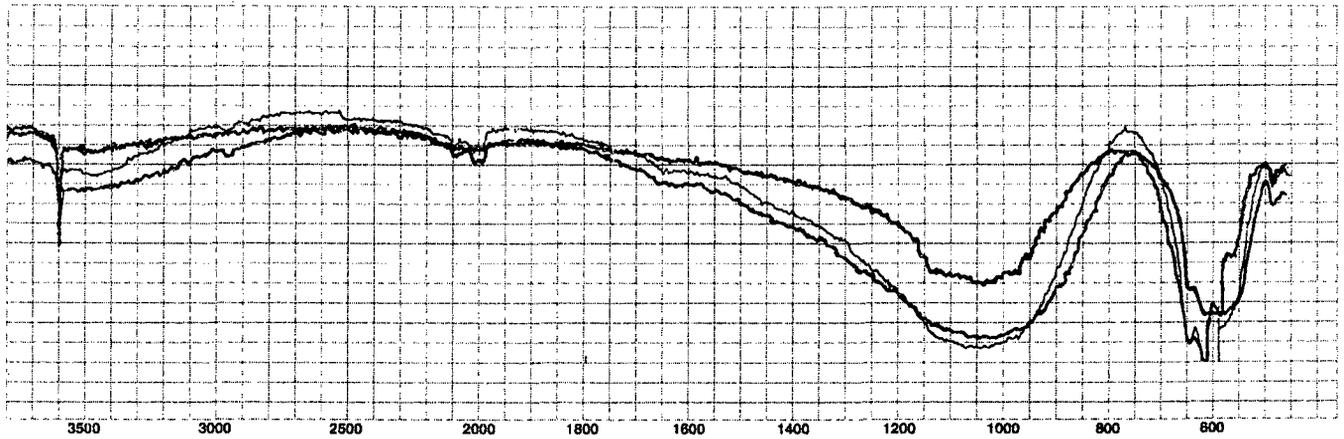


Figura 1. Espectro IR de hidroxiapatita no reabsorbible obtenida en las síntesis 3,4 y 5.

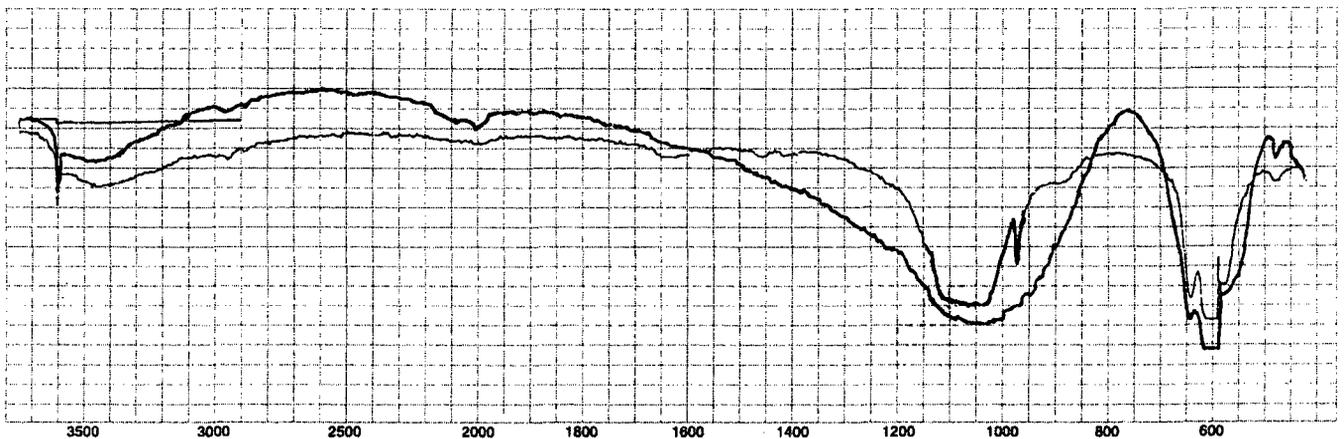


Figura 2. Espectro IR de hidroxiapatita calcinada a 800 y 1.100°C. Síntesis 5, [Pelkin Elmer 467 I.R.-FT.]

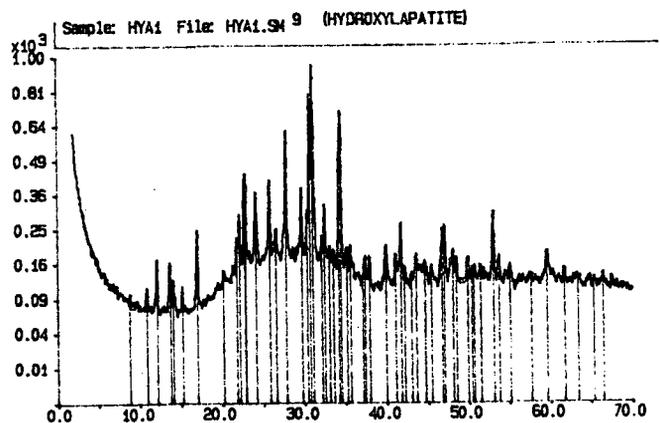
#### B. ESPECTRO IR. ESTRUCTURA.

Aparecen las bandas características de los grupos componentes de la molécula (veáanse figuras 1 y 2)

1. Vibración a  $3570\text{ cm}^{-1}$ , típica del grupo  $\text{OH}^-$ , para diferenciarla de otros fosfatos de calcio y considerarla como apatita.
2. Estiramiento intenso y ancho entre  $1.000$  y  $1.150\text{ cm}^{-1}$ , típico del fosfato de apatita. A diferencia de otros fosfatos (banda más aguda que se explica por la presencia del grupo  $\text{OH}^-$ ).
3. Banda característica del grupo  $\text{O-P-O}$ , entre  $550$  y  $600\text{ cm}^{-1}$  del grupo fosfato.
4. Ausencia de bandas en la región  $1.420-6\text{ cm}^{-1}$  perteneciente a carbonato.
5. El IR del producto sometido a  $800-900\text{ }^\circ\text{C}$ , presenta banda más aguda en la región  $1.000-1.150\text{ cm}^{-1}$  y similar a la de los fosfatos normales y puede incluir bandas en la zona  $1.420-6\text{ cm}^{-1}$  de  $\text{CO}_3$ .

#### C. DIFRACCIÓN DE RAYOS X.

Los picos principales encontrados en el difractograma (Veáse Figura 3) son:  $2,87\text{ }^\circ$ ,  $2,60\text{ }^\circ$  y  $2,07\text{ }^\circ$ .



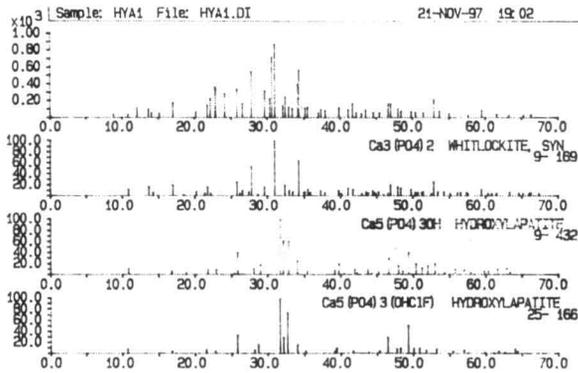


Figura 3 Difractograma de Rayos X de hidroxiapatita no reabsorbible, síntesis 5 Difractómetro de rayos x Philips. Picos principales:  $2,87 \text{ \AA}$ ,  $2,60 \text{ \AA}$  y  $2,07 \text{ \AA}$ .

#### D. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA: TEXTURA.

En las microfotografías SEM de las figuras 4 y 5 se observa la unidad cristalina de la apatita, y su correspondencia con la del producto sinterizado a  $1.100^\circ\text{C}$ , cuya superficie se ve formada por agregados cristalinos grandes ( $1.000 \text{ \AA}$  en promedio), densos y homogéneos, típicos de un material cerámico.

Comparando la SEM se ve la similitud de la microestructura del hueso (Veáse figura 7) y el producto cerámico ( Veáse figura 8).

El producto a  $900^\circ\text{C}$ , muestra estructura superficial microporosa, con gránulos de menor tamaño ( $200 \text{ \AA}$  en promedio) (Veáse figura 6).



Figura 4. Microfotografía de barrido electrónico SEM 1.000X donde se identifica el cristal de la apatita [14]

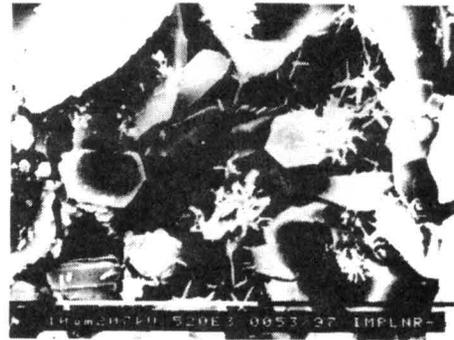


Figura 5. Microfotografía de barrido electrónico SEM, 5000X, 30KV de hidroxiapatita síntesis 5

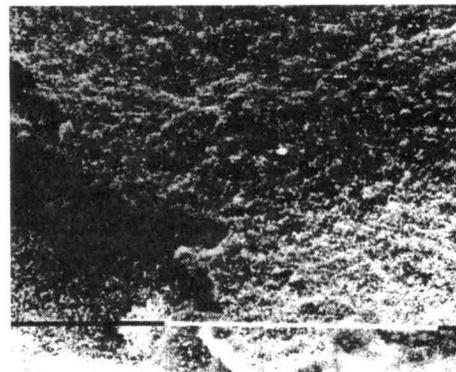


Figura 6. Microfotografía SEM, 560x de hidroxiapatita a  $800^\circ\text{C}$ , síntesis 1.

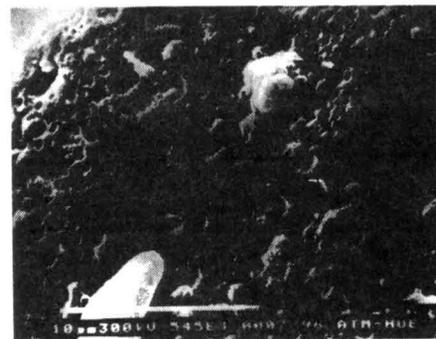


Figura.7. Microfotografía de barrido electrónico SEM, 5450X,30KV, de hueso condilar humano. (Cortesía del Dr. Luis Alberto Campos)

## Síntesis y Análisis de Hidroxiapatita

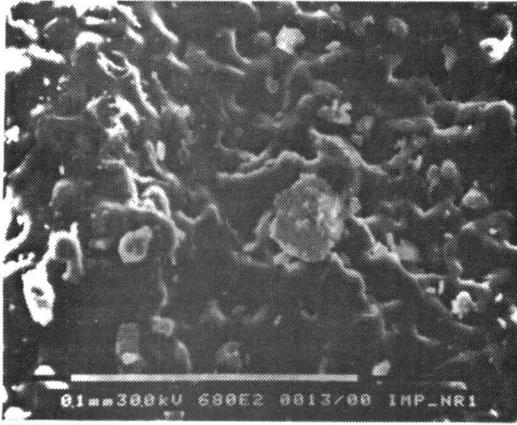


Figura 8. Microfotografía Síntesis 5 SEM, 680X,30KV, de Hidroxiapatita no reabsorbible

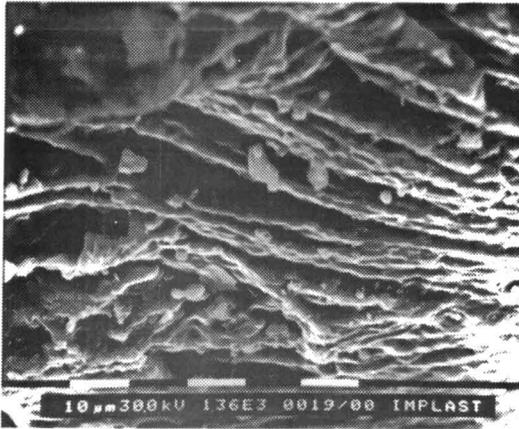


Figura 9. Microfotografía de barrido electrónico SEM, 1360X, 30KV, de hidroxiapatita no reabsorbible; síntesis 5.



Figura.10 . Microfotografía de barrido electrónico,SEM 341X,30KV, de hidroxiapatita no reabsorbible, síntesis 5

### E. DENSIDAD VERDADERA.

Se determinó una densidad de 3,1 g/cm<sup>3</sup> de acuerdo con las normas ASTM para HA.

### F. DETERMINACIÓN DE IMPUREZAS O ENSAYOS LÍMITES OFICIALES USP XXIII.

Las especies determinadas según la USP, reportan resultados inferiores a los límites establecidos (cuadro 2), indicando que no hay impurezas.

CUADRO 2. PRUEBAS LÍMITES OFICIALES USP XXIII PARA HIDROXIAPATITA, EFECTUADAS AL PRODUCTO DE HA OBTENIDO.

Prueba	Límite	Resultado	Conclusión
Pérdida por ignición	8%	0,005%	Cumple
Sustancias insolubles en ácido	0,2%	Solubiliza totalmente en HCl 3N	Cumple
Cloruro	0,14%	Turbidez inferior al patrón	Cumple
Sulfato	0,3%	Turbidez inferior al patrón	Cumple
Arsénico	8ppm	Contenido inferior al patrón	Cumple
Metales pesados	0,003%	Contenido inferior al patrón y mucho menor que en el monitor.	Cumple.

### G. ESTABILIDAD ACELERADA.

En todas las muestras analizadas la prueba de calcio es negativa. (Vease cuadro 3)

CUADRO 3. RESULTADOS DEL ESTUDIO COMPARATIVO DE ESTABILIDAD ACELERADA DE LA HIDROXIAPATITA NO REABSORBIBLE OBTENIDA SEGÚN LA SÍNTESIS 5, VERSUS HA1 Y HA2.

Producto	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10
HA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HA síntesis 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Pruebas Cualitativas de Calcio, 10 meses, 37°C, pH 6,5

## IV. DISCUSIÓN

### A. COMPOSICIÓN.

#### 1. ADICIÓN DE LOS REACTIVOS.

Cuando las especies se adicionan a tasas aproximadamente iguales y a un mismo tiempo (12ml/min), la composición de HA obtenida se favorece, lo que permite aceptar que se optimiza la composición de la relación molar Ca/P=1,67.

#### 2. ATMÓSFERA INERTE.

La ausencia de bandas características de CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, en los productos obtenidos en las síntesis 4 y 5 (figuras 1 y 2), demuestra la importancia de evitar la presencia de aire ambiental durante el proceso de síntesis, constituyendo una condición *sine qua non* para obtener HA estequiométrica libre de carbonato.

### 3. TEMPERATURA

El efecto de la temperatura en las propiedades fisicoquímicas del producto se logra al someterlo entre 1.000 y 1.100°C, pues se pierde agua y carbonato y se produce un material cerámico denso, equivalente a una oxihidroxiapatita con un Kps de  $1 \times 10^{-17}$  M. (HA estequiométrica) [1]. (véase figura 8).

Cuando el sólido precipitado recibe un tratamiento térmico entre 800 y 900°C no logra propiedades biocerámicas y se observa microporoso, con propiedades fisicoquímicas de una *hidroxiapatita calciodeficiente* con un Kps de  $1 \times 10^{-65}$  M [1] (véase figura.6).

El proceso de sinterización permite la producción de una HA que por ser una porcelana es de consistencia dura, con una constante de solubilidad de  $1 \times 10^{-17}$  M (=0) y se puede definir como no reabsorbible cuando se implanta en los tejidos del cuerpo. Esta es la molécula de HA pura, estequiométrica cuya relación Ca/P=1,67, su espectro IR da las bandas OH<sup>-</sup> a  $3.570 \text{ cm}^{-1}$  muy aguda y del fosfato apatítico a  $1.000\text{-}1.100 \text{ cm}^{-1}$ , ancha y su microestructura es cristalina y organizada en gránulos grandes como corresponde a un material cerámico. (véanse figuras 8 y 9)

Al someter el sólido precipitado a una temperatura de 800°C, no se logran propiedades cerámicas, el producto es menos resistente y puede acomodar agua y/o carbonato en su molécula según lo aclaran los espectros de las figuras 2 y 6. En éste caso el producto es más soluble (Kps  $1 \times 10^{-65}$  M), comparable a una hidroxiapatita calciodeficiente  $\text{Ca}_5(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_3 \text{OH}$ , cuya relación Ca/P es 1,50.

### 4. PUREZA

De acuerdo al difractograma de la Figura 10, se puede establecer la pureza del material obtenido en la síntesis 5. Los picos principales observados son característicos del cristal de la hidroxiapatita, por lo que se identifica el producto como tal. Con las síntesis 1 y 2, se observan picos de beta whitlockita en una proporción aproximada del 30%.

### B. PATRONES

Se tomaron como patrones dos productos norteamericanos empleados exitosamente en la clínica para la reconstrucción de defectos óseos, a los cuales se les analizaron las propiedades fisicoquímicas de composición, estructura y textura por los métodos descritos en éste estudio.

Considerando los resultados obtenidos en los análisis fisicoquímicos de éstos tres productos se puede afirmar:

1. La relación Ca/P=1,67 es igual en los tres casos, lo que significa composición química similar o equivalente. (véase cuadro 4)

CUADRO 4. ESTUDIO COMPARATIVO DE COMPOSICIÓN. RELACIÓN MOLAR Ca/P: HA OBTENIDA VERSUS HA1 Y HA2.

Producto	Mmol Ca	Mmol P	Ca/P
HA1	0.677	0.406	1.667± 0.040
HA2	0.678	0.406	1.670± 0.002
HA obtenido	0.678	0.405	1.674± 0.002
Hidroxiapatita			1.67

2. En los espectros IR de las Figuras 11 y 1 se aprecian los grupos presentes en la molécula  $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ ; OH<sup>-</sup>, O.P.O, P=O, destacándose en los tres productos el estiramiento agudo a  $3.570 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente al OH<sup>-</sup> y la banda ancha a  $1.000 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente al fosfato apatítico, indicando que la estructura química es igual en los tres productos.

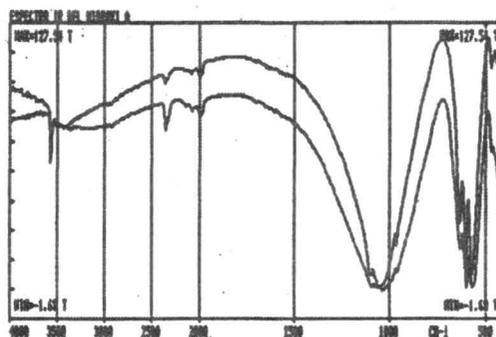


Figura 11. Espectro IR de los productos control de USA: (HA1 y HA2)

3. La SEM permite observar en todos los casos una unidad cristalina característica de la hidroxiapatita, indicando que son productos puros y equivalentes. (véanse figuras 12, 13, 14).

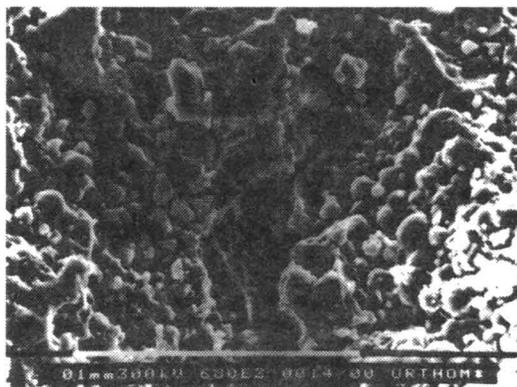


Figura 12. Microfotografía de barrido electrónico SEM 680X, 30KV, del Producto control HA1

4. De acuerdo a los resultados de estudio de estabilidad acelerada pueden caracterizarse los tres productos como no reabsorbibles.

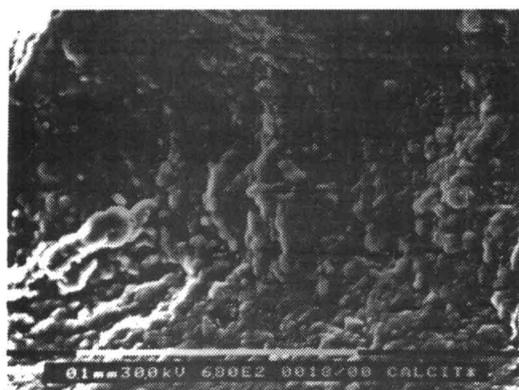


Figura 13. Microfotografía de barrido electrónico SEM, 680X, 30KV, producto control HA2



Figura 14. Microfotografía de barrido electrónico SEM, 680X, 30KV, de hidroxiapatita no reabsorbible, síntesis 5

#### AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos al Dr. Fabio Córdoba por su valioso aporte en la investigación química y al Dr. Luis Alberto Campos por su generosa contribución en la investigación clínica del producto.

#### CONCLUSIONES

De acuerdo con los análisis fisicoquímicos realizados, el producto en estudio IMPLASTIC-HA:

1. Es HA pura.
2. Posee propiedades fisicoquímicas que le permiten ser utilizado como material de implante óseo.
3. Es equivalente a los productos de fabricación norteamericana usados como controles.
4. Con base en éstos análisis se puede inferir que el método de síntesis empleado da lugar a un producto identificado como

hidroxiapatita pura, estequiométrica y con propiedades de superficie y estructura idóneas como material de implante óseo en forma reabsorbible o no reabsorbible.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. BONEL, G. *et al*: "Apatitic calcium orthophosphates and related compounds for biomaterial preparation". *Annals of the New York Academy of Sciences*. 523; 115-130; 1988.
2. CALDERON, G. E. *Química analítica aplicada*. Tomo I. Universidad Nacional, Bogotá 1971: 127-140.
3. CAMPOS, L.A, RODRÍGUEZ, M.D. "Estudio sobre biorresorción y biocompatibilidad de hidroxiapatita cerámica producida en Colombia". *Trib. Odont.* 3:33-36, 1995.
4. —————: "Reconstrucción de los rebordes alveolares y estímulo de la mineralización ósea mediante el empleo de hidroxiapatita reabsorbible y no reabsorbible producida en Colombia" *Journal de Clínica en Odontología* 11; 19-22; 1996.
5. HENCH, L.H: "Bioactive ceramics". *Annals of the New York Academy of Sciences. Bioceramics*: 523;54-71;1988.
6. JARCHO, M., BOLEN, C.H "Hydroxyapatite synthesis and characterisation in dense polycrystalline form". *J of Material Sciences* 11; 2027-2035.;1976
7. LACEFIELD, W.R: "Hydroxyapatite coatings". *Annals of the New York Academy of sciences*. 523; 72-82; 1988.
8. MORRISON, R.T, BOYD, R.N. *Química orgánica*; Fondo Educativo Interamericano. Boston 1976; 556.
9. MURPHY, J., RILEY, J. *Journal of Marine Biology Assoc United Kingdom*. 37:9-14;1968.
10. RODRÍGUEZ, M.D., PAREDES, C. *Síntesis de hidroxiapatita y su acondicionamiento como material protésico de tejido duro*. Tesis de Grado, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá 1989.
11. UNITED STATES PHARMACOPEIA USP XXIII. pp 224y 259
12. ——— pp 1791-1792 y 2223-2224.
13. ———. pp. 1724- 1728.
14. WELTON, J.E. *SEM Petrology Atlas*. The American Association of Petroleum Geology. Oklahoma, 1984. pp.176-177.