

Estudio de las condiciones para la síntesis de la hidroxiapatita y el β -fosfato tricálcico

Reyes Santoyo Ana Belen*, Juárez Robles Diana Elizabeth, Chávez García María de Lourdes

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Laboratorio de Cerámica. Av. Universidad 3000, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México. C.P. 04510, México.

*Autor para correspondencia: anna-reyes@live.com.mx

Recibido:

13/mayo/2018

Aceptado:

27/julio/2018

Palabras clave:

Hidroxiapatita,
 β -fosfato tricálcico

Keywords:

Hydroxyapatite,
 β -tricalcium phosphate

RESUMEN

El propósito de este estudio es encontrar las condiciones de síntesis reproducibles para obtener una HAP y un β -TCP, de fase única, con una pureza >99% y, de tamaño de partícula entre 20 y 60 nm; debido a la falta de congruencia en los procedimientos. El estudio se desarrolló, por el método de co-precipitación, con el control y la variación de las condiciones de reacción, de añejamiento y de cristalización. El seguimiento de los resultados se hizo por IR-TF y DRX. Los resultados para el β -TCP, mostraron la fase bifásica formada por β -TCP, con una cantidad mínima de HAP. En el caso de la HAP se estableció una metodología reproducible, para una pureza mayor al 99%, un tamaño 31.86 nm; similar a 35.54 nm a una, de tipo bovino. La HAP funcional sintetizada se usará en el diseño de andamios bioactivos mediante la impresión 3D para regeneración del tejido óseo.

ABSTRACT

The aim of this study is obtain reproducible synthesis conditions for the HAP and the β -TCP, as unique phase, with a purity >99% and particle size of 20-60 nm; due to incongruence in procedures. The study was performed with the co-precipitation method, varying the conditions of reaction, aging and crystallization. The XRD and FT-IR were used to follow the procedures. The synthesis results of β -TCP showed a biphasic phase formed with β -TCP and a minimum amount of HAP. In the case of the HAP, a reproducible methodology was established, with a purity >99% and size of 31.86 nm, similar to one bovine of 35.54 nm. The HAP functional synthesized will be used in the design of bioactive scaffolds by printing 3D for bone tissue regeneration.

Introducción

Los fosfatos de calcio son los biocerámicos, responsables de la resistencia a la compresión y la rigidez, en los huesos. Forman aproximadamente el 70% del peso seco, de los mismos (Eliaz y Metoki, 2017; Narayanan et al., 2016). Los cuales, están formados por: la hidroxiapatita (HAP), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, con una relación Ca/P de 1.67 y el β -fosfato tricálcico (β -TCP), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, con Ca/P de 1.5.

La hidroxiapatita (HAP) se obtiene de forma natural, a partir de los huesos del cóndilo de origen bovino, se ha usado como biomaterial, en implantes; y, sirve como punto de comparación para las hidroxiapatitas sintéticas (Narayanan et al., 2016). Los procesos de obtención, de la HAP bovina, son complicados, requieren de lavados con HCl o, temperaturas de 600°C para eliminar la materia orgánica, seguido de temperaturas de cristalización de 700 a 1000°C, con costos elevados (Londoño et al., 2016). Por ello, la síntesis de la HAP y el β -TCP es de interés científico, por su preparación sencilla y, por sus aplicaciones tecnológicas como biomateriales. Las rutas de síntesis ensayadas incluyen: el método cerámico, el mecanoquímico, la combustión, el de sol-gel, el hidrotermal, las micro-emulsiones y la co-precipitación, siendo esta última, la que ofrece sencillez de síntesis, con pureza y rendimientos mayores al 99% y, control del tamaño de partícula, menor a los 100 nm (Eliaz y Metoki, 2017; Lee et al., 2016). Como es el caso de la HAP, con estas características necesarias para su integración, con polímeros para la impresión de andamios de biomateriales, en la sustitución de tejido óseo (Kim et al., 2016; Juárez et al., 2017).

Las investigaciones de la HAP, por el método de co-precipitación, no coinciden, debido a que cada autor presenta sus condiciones, de tal manera que entre ellos varían en intervalos amplios; se describen tiempos de reacción, desde 1 hasta 3 h, con temperaturas desde 50 hasta 80°C y, pH de 7 a 11; en cuanto a los tiempos de añejamiento para la obtención de un precipitado uniforme van de 1 a 14 días; y, con temperatura de cristalización, desde los 600 hasta 1000°C, con tiempos de 1 a 48 h (Luo et al., 2015; Suksomran y Molloy, 2017). Esta falta de uniformidad en las metodologías, con diferencias amplias en sus condiciones, falla al intentar reproducirlas.

El β -TCP se ha sintetizado por estado sólido a partir, del fosfato de dihidrógeno anhidro (CaHPO_4), denominada monetita, la que se obtiene del fosfato de dihidrógeno

dihidratado, o brushita a través, de ser secada a 105°C, 2 h para su posterior almacenamiento hasta la reacción, con el CaCO_3 , para su cristalización, a los 900°C, el tamaño de partícula del producto es del orden micrométrico (Jinlong et al., 2001). Debido a que, la β -TCP es requerida de tamaño nanométrico para las aplicaciones biomédicas, la síntesis, por el método de co-precipitación es una opción; la cual, requiere de un control cuidadoso de las condiciones, desde la estequiometría, la temperatura, el tiempo y el pH de reacción, así como de sus condiciones de añejamiento y cristalización; una variación ligera de éstas, ha sido publicado que, genera cambios en la composición final del productos, dando las fases de pirofosfato de calcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) o la HAP (Eliaz y Metoki, 2017). El sistema binario $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$, que incluye H_2O (Anexo, Figura 5) y, del cual se parte para la síntesis, ha demostrado de forma teórica que, el β -TCP no se obtiene de forma directa, en un paso. Las investigaciones han sugerido, que el orden de precipitación es, a través, del fosfato apatítico tricálcico, con una relación Ca/P de 1.5, $[\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}]$ y, a partir de éste, su transformación al β -TCP arriba de los 900°C. La mayoría de las publicaciones mencionaron la obtención de la fase bifásica constituida, por el β -TCP y la HAP (Dorozhkin, 2016; Owen et al., 2017); algunas cuantas, mencionaron que consiguieron la fase pura (Ghosh y Sarkar, 2016; Lee et al., 2016).

Este estudio surge, de un trabajo previo, en donde se tuvo la necesidad de contar con fases puras para ser usadas en el diseño de andamios bioactivos para la regeneración ósea (Juárez et al., 2017). Por lo que el propósito de este estudio es encontrar las condiciones de síntesis de la HAP y del β -TCP, como fase única, una pureza >99% y, un tamaño de partícula nanométrico entre los 20 y 60 nm. De tal forma que, la metodología sea reproducible, para su posterior integración, con polímeros y, su conformación en andamios, por impresión 3D, para la obtención de biomateriales, en la regeneración ósea. Los parámetros de la síntesis a variar serán, la temperatura, el tiempo y el pH de la reacción, así como la temperatura y el tiempo de añejamiento y, de cristalización. Este proceso se seguirá, por medio de las técnicas de caracterización de difracción de rayos X de polvos (DRX), espectroscopía de absorción infrarroja por transformada de Fourier (IR-TF) y, el cálculo del tamaño de partícula por la ecuación de Scherrer.

Como referencia especial útil en el presente trabajo se incluye la figura 1, que muestra el diagrama de fases de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ con H_2O .

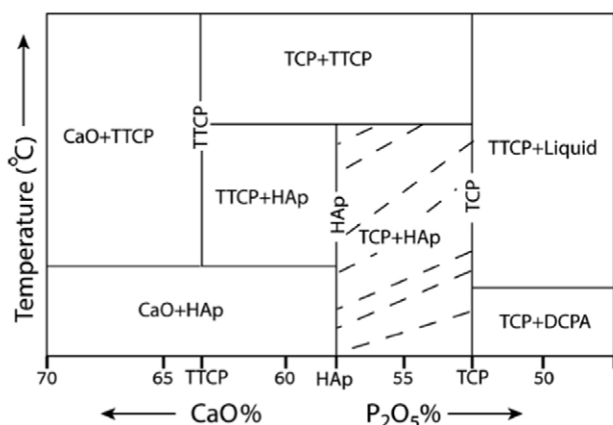


Figura 1. Equilibrio de fases de CaO-P₂O₅ con H₂O, la región sombreada, muestra la fase bifásica del fosfato de calcio HAP con β-TCP (Eliasz y Metoki, 2017).

Metodología

Reactivos

Nitrato de calcio tetrahidratado, Ca(NO₃)₂·4H₂O, de APLL Engineered Materials, inc., pureza 99.95%. El fosfato de amonio dibásico, (NH₄)₂HPO₄, pureza 99.98% y el hidróxido de amonio, NH₄OH, al 28.49%, de J.T. Baker, C.

Equipo

Difracción de rayos X de polvos (DRX)

La caracterización de las fases se realizó, en un difractómetro Siemens D5000, radiación de CuK_{α1} filtrada con Ni, λ= 1.5406 Å, con una constante de tiempo de 0.4 y constante de paso angular de 0.02, a 30 Kv y 25 mA, de 10° a 65° de 2θ.

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (IR-TF)

La caracterización de grupos funcionales, se analizaron en un equipo Fourier, Bruker Vector 22FTIR, en el infrarrojo medio de 4000 a 400 cm⁻¹.

Tamaño de partícula

La determinación del tamaño de partícula se realizó, por medio de la ecuación de Scherrer, con base en el difractograma de rayos X. En donde, se midió el ancho, a la mitad de la señal con intensidad mayor, por medio de la ecuación siguiente: (Hruschka et al., 2017).

$$T = \frac{\lambda * 0.89}{\beta \cos \theta}$$

Donde: λ= longitud de onda de rayos X; β= la intensidad de la señal mayor; θ= ángulo de Bragg; = tamaño del cristal.

Síntesis de HAP

La HAP se sintetizó a partir de las disoluciones de Ca(NO₃)₂·4H₂O y (NH₄)₂HPO₄, con la adición por goteo, de la primera, a la segunda, con agitación constante, en intervalos de pH de 7 a 11, de 35 a 65°C, de 20 min a 3 h; al finalizar la adición, la reacción se dejó en reposo, 24 h. El sólido formado se filtró y lavó con H₂O destilada, con posterior secado a 80°C y, su cristalización se realizó de 600 a 1000°C, de 8 a 24 h. Las muestras se realizaron por quintuplicado para reproducir las condiciones de síntesis.

Síntesis de β-TCP

El β-TCP se sintetizó a partir de la adición de la disolución de Ca(NO₃)₂·4H₂O, por goteo, a la, de (NH₄)₂HPO₄, con agitación constante, a un pH de 7, a 45°C, por 3 h; con posterior reposo, durante 24 h. El producto se separó y lavó con H₂O destilada, se secó a 80°C y, su cristalización a 900°C, durante 14 h.

Resultados y discusión

Síntesis

Hidroxiapatita, HAP

La HAP pura se sintetizó por el método de coprecipitación, los resultados de este estudio presentan el esfuerzo final para encontrar, las condiciones de síntesis necesarias para reproducir la HAP pura. Debido a, la falta de consenso en las metodologías propuestas, por autores distintos (Hruschka et al., 2017; Luo et al., 2015; Suksomran y Molloy, 2017).

En este estudio, las condiciones de síntesis reproducibles para elaborar una HAP pura fueron: la temperatura de reacción a 65°C; ya que, a una temperatura mayor, el agua inicia su evaporación, por consiguiente se tiene una disminución del volumen, con la pérdida del control del pH; con un tiempo de reacción de 3h; y, con un control del pH de 10 a 11, debido a que, si es menor a 10 se produce la HAP con mezcla del β-TCP, en coincidencia con

otro trabajo (Hruschka et al., 2017). El tiempo mínimo de añejamiento para la precipitación del sólido fue de 24 h. La cristalización fue a 700°C, durante 14 h, ya que, a una temperatura menor a ésta, la fase no se obtiene y, con una, mayor a los 1000°C, la β -TCP inicia su formación (Suksomran y Molloy, 2017; Luo et al., 2015).

La síntesis por quintuplicado de la HAP garantizó la reproducibilidad, de las condiciones para obtener, con una pureza >99%, sin fases adicionales y, de tamaño nanométrico, de 31.86 nm, similar a la HAP-B de 35.54 nm en coincidencia con otros trabajos (Narayanan et al., 2016; Luo et al., 2015). Lo cual, permite una HAP funcional para su integración con polímeros, en la producción de biomateriales compuestos, para su conformación en andamios por impresión 3D y su aplicación, en la regeneración ósea (Kim et al, 2016).

β -fosfato tricálcico, β -TCP

Las condiciones de síntesis para obtener, una β -TCP como fase única, fueron controladas cuidadosamente. Para lo cual se probaron condiciones diferentes, como fueron: la temperatura de reacción de 35, 45 y 50°C, con tiempos de 1 a 3 h y, el pH de 7 a 11; añejamiento por 24 h; y, la cristalización, desde los 700 hasta 1000°C y de 3 hasta 14 h.

Se puede asumir que fue posible establecer las condiciones de síntesis del β -TCP a 35°C, durante 3 h a un pH de 7; con un añejamiento a 22°C, por 24 h y, una cristalización a 900°C, durante 14 h. Los resultados del producto, por DRX y confirmados por IR-TF, mostraron la formación de la fase bifásica, con la obtención del β -TCP y una cantidad mínima de HAP (Figura 3 y 4); con tamaño de partícula nanométrico. Por lo que, para obtener un β -TCP puro. Algunos autores sugieren mantener el pH, entre 6 y 7, evitando la formación de otras fases, entre ellas la HAP. La relación Ca/P precisa en 1.5, un cambio ligero del 1% podría generar fases secundaria, una variación mayor ha mostrado la formación de la HAP; y una, menor, al $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, (Ebrahimia et al., 2017). El añejamiento, se ha relacionado, con el tiempo necesario para la formación del β -TCP; algunos autores mencionaron que, a un tiempo mayor de 24 h, la relación de Ca/P aumentó, relacionado a la producción de la HAP. El tiempo y la temperatura de cristalización, tienen una influencia directa en el tamaño de partícula (Eliazzy Metoki, 2017).

Difracción de rayos X de polvos

La caracterización del cerámico por DRX confirmó la formación de la HAP como una fase pura, similar a la de la HAP-B.

Hidroxiapatita, HAP

El análisis de la HAP, por DRX determinó una fase, sin adicionales, identificada como hidroxiapatita pura, al igual que la HAP-B, Figura 2.

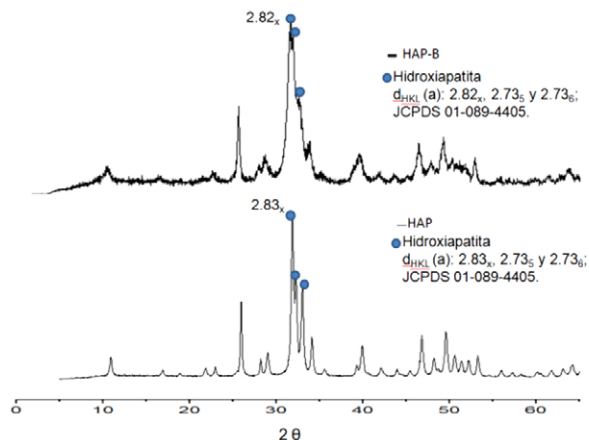


Figura 2. Difractograma de RX de la HAP sintética y, la HAP-B de origen bovino.

β -fosfato tricálcico, β -TCP

En el difractograma de DRX para el β -TCP, se observó la formación de la fase bifásica, constituida, por el β -TCP en proporción mayor y, la segunda por, a la HAP, Figura 3.

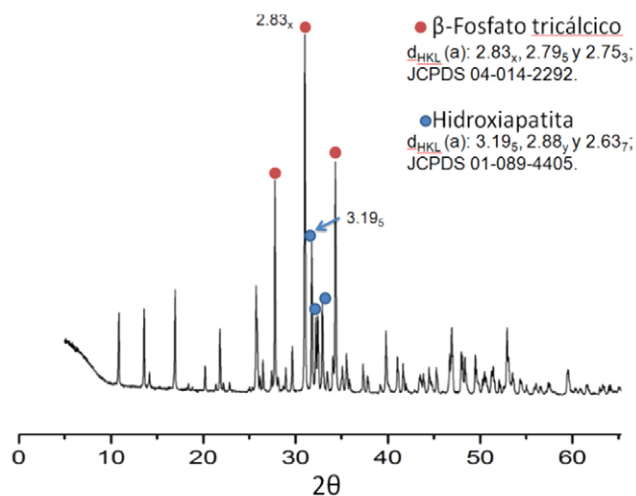


Figura 3. Patrón de DRX del β -TCP sintético.

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Hidroxiapatita, HAP

El análisis del espectro, de IR-FT para la HAP y la HAP-B, mostró las señales en 730 y 1000 cm^{-1} , relacionadas a los

modos de tensión asimétricos del enlace P-O; mientras que, en 580 cm^{-1} se identificó la vibración de flexión del enlace O-P-O. En la HAP-B se apreciaron bandas similares, que en la HAP, a excepción de la, de 3570 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de estiramiento del enlace O-H estructural y las, adicionales en 1400 y 800 cm^{-1} se atribuyeron a la señal de estiramiento del C-O, lo que sugirió la presencia de carbonatos, debida a la exposición atmosférica, una vez purificada (Ebrahimia et al., 2017), Figura 4.

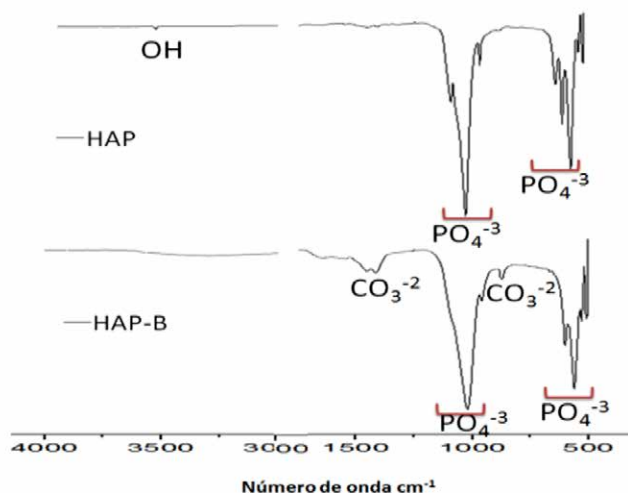


Figura 4. Espectro de IR-TF de la HAP sintética y, la HAP-B, de origen bovino.

β -fosfato tricálcico, β -TCP

El espectro de IR-FT, del β -TCP, mostró para las bandas en 580 - 680 y 1000 cm^{-1} , correspondieron a los modos de vibración de estiramiento simétricos, asociados a los PO_4^{-3} , característicos del β -TCP, a diferencia de los asimétricos de la HAP; lo cual se ha explicado, por el cambio de vibración, debida a la mezcla de fosfatos, del β -TCP y de la HAP (Ca/P entre 1.5 y 1.67, respectivamente). Las bandas en 800 y 1100 cm^{-1} , se correlacionó a la vibración de estiramiento del enlace P-O. La señal en 3500 cm^{-1} asociada a la vibración del enlace O-H, de la HAP, no se apreció; algunos autores, lo han atribuido a que, el β -TCP está en una proporción mayor, en la fase bifásica (Owen et al., 2017; Ebrahimia et al., 2017), Figura 5.

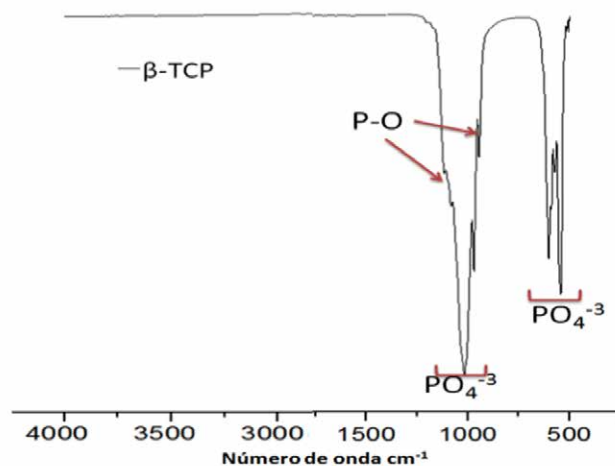


Figura 5. IR-TF del β -TCP sintético.

Tamaño de partícula

Hidroxiapatita, HAP

El tamaño de partícula de la HAP dio un valor de 31.86 nm y, para la HAP-B, de 35.54 nm , (Kim et al, 2016).

β -fosfato tricálcico, β -TCP

El tamaño de partícula para el β -TCP fue de 51.33 nm y, para la HAP de 61.59 nm .

Conclusiones

En este estudio, se obtuvo una HAP con una pureza mayor al 99% y, un tamaño de partícula de 31.86 nm ; con características similares a las, de la HAP-B, de 35.54 nm . Para su integración con polímero, en la conformación de biomateriales compuestos, por impresión 3D para ser usado en la regeneración ósea. La HAP pura se sintetizó, a través del estudio de las condiciones de síntesis; estableciendo una metodología reproducible. Así como, su confirmación, con su análisis por IR-TF; con la señal en 3500 cm^{-1} del O-H estructural, en coincidencia con la de otros autores (Dorozhkin, 2016; Ebrahimia et al., 2017).

La síntesis del β -TCP, por el método de co-precipitación, proporcionó una mezcla con HAP en una cantidad mínima; con tamaño de partícula promedio de 51.33 nm , conforme a los resultados en IR-TF y DRX. La eliminación de la HAP se realizará por medio del control del pH, entre 6 y 7; una relación Ca/P de 1.5; probando tiempos de añejamiento menor a las 24 h; y control de la temperatura de cristalización.

Agradecimientos

Al financiamiento del proyecto PAIP 5000-9038 de la Facultad de Química, UNAM. Las autoras agradecen las facilidades del Laboratorio del Dr. David Díaz de la Facultad de Química, UNAM; a la M en C. Cecilia Salcedo (USAI, Facultad de Química, UNAM). Al Dr. Epifanio Cruz Zaragoza, por proporcionar la muestra de HAP-B (IIN, UNAM),.

Bibliografía

Dorozhkin S. (2016). Multiphasic calcium orthophosphate (CaPO_4) bioceramics and their biomedical applications. *Ceramics International*. 6: 6529-6554.

Ebrahimia M., Botelho M., Dorozhkin S. (2017). Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Materials Science and Engineering*. 71: 1293-1312.

Eliáz N., Metoki N. (2017). Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials*. 10: 334.

Ghosh R., Sarkar R. (2016). Synthesis and characterization of sintered beta-tricalcium phosphate: A comparative study on the effect of preparation route. *Materials Science and Engineering*. 67: 345-352.

Hruschka V., Tangl S., Ryabenkova Y., Heimel P., Barnewitz D., Möbus G., Keibl C., Ferguson J., Quadros P., Miller C., Goodchild R., Austin W., Redl H., Nau T. (2017). Comparison of nanoparticulate hydroxyapatite pastes of different particle content and size in a novel scapula defect model. *Scientific Reports*. 7: 43425.

Jinlong N., Zhenxi Z., Dazong J. (2001). Investigation of Phase Evolution During the Thermochemical Synthesis of Tricalcium Phosphate. *Journal of Materials Synthesis and Processing*. 9: 235-245.

Juárez D., Salas S., García T., Chávez M. (2017). Síntesis de nano-hidroxiapatita por los métodos sol-gel y co-precipitación. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*. ISSN: 2448-6663.

Kim H., Lee H., Knowles J. (2016), Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration. *Journal of Biomaterials*. A: 643-649.

Lee D., Pai Y., Chang S., Kim DH. (2016). Microstructure, physical properties, and bone regeneration effect of the nano-sized β -tricalcium phosphate granules. *Materials Science and Engineering*. 58: 971-976.

Londoño S., Ramirez C., Real A., Rubio E., Rodriguez M. (2016). Study of bovine hydroxyapatite obtained by calcination at low heating rates and cooled in furnace air. *Journal of Materials Science*. 51: 4431-4441

Luo J., Chen J., Wenzhao L., Zhiliang H., Chen C. (2015). Temperature Effect on Hydroxyapatite Preparation by Co-precipitation Method under Carbamide Influence. *EDP Sciences*. 26: 1004-1007

Narayanan G., Vernekar V., Kuyinua E., Laurencin C. (2016). Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopedic regenerative engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 107: 247-276.

Owen R., Dard M., Larjava H. (2017). Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. *Journal of medical Materials*. doi: 10.1002/jbm.b.34049.