



 2^{do} Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales – Posadas – Misiones, 16 - 17 Octubre 2008.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS APATITAS. SU UTILIZACION COMO BIOMATERIAL.

P. Fernigrini, O.R. Cámara y F. Y. Oliva

Directora: Fabiana Y. Oliva Departamento de Físico Química - Universidad Nacional de Córdoba Pabellón Argentina, Ala 1, 2do piso Ciudad Universitaria, A.P. 4, C.C.61, 5000 Córdoba. Email: paulafernigrini@hotmail.com, foliva@mail.fcq.unc.edu.ar

TÓPICO: BIOMATERIALES

RESUMEN

Existen diferentes tipos de apatitas naturales y sintéticas (fosfatos de calcio). En las sintéticas varios elementos pueden sustituir las posiciones de Ca^{2+} , PO_4^{3-} y OH, generando distintos tipos de vacancias y de cristalinidad, dando origen entre otros compuestos a la hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). La similitud química y estructural de la hidroxiapatita con el mineral del hueso sugiere una biocompatibilidad intrínseca actuando como promotora del crecimiento óseo. Es considerada la principal fase mineral constituyente de los huesos razón por la cuál estudiamos su aplicación como biomaterial. Sólo pequeñas cantidades de flúor son necesarias para promover la cristalización de fluorapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 - x(F)_x$), especie que es mecánica y químicamente más resistente.

El objetivo del trabajo es caracterizar y comparar las propiedades de las distintas apatitas sintetizadas, a fin de aprovechar sus diferencias estructurales y las interacciones con superficies de titanio y moléculas biológicas, de manera tal que se puedan depositar sobre distintos implantes disminuyendo el índice de rechazo.

Se llevaron a cabo distintos métodos de síntesis y se comprobó la eficiencia de sustitución de OH por F y las características de los polvos obtenidos mediante el uso de diferentes técnicas: Difracción de Rayos X, Isotermas BET, FTIR y Microscopía electrónica de Barrido (SEM) entre otras.

Palabras claves: Apatitas Sustituidas, Caracterización, Biocompatibilidad.

INTRODUCCIÓN

El mineral apatita $(Ca_{10} (PO_4)_6 X_2 \text{ donde } X \text{ puede ser } F^-, OH^- o Cl^-)$, es el fosfato de calcio natural más abundante en la superficie terrestre y la principal fuente de fósforo por lo que es de gran importancia en distintos campos de investigación así como en la industria.

La estructura y la composición química de las apatitas pueden presentar numerosas sustituciones incluyendo cationes metálicos tales como K⁺, Na⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ y Zn²⁺ entre otros en la posición del Ca²⁺ y complejos aniónicos como AsO₄³⁻, SO₄²⁻, CO₃²⁻ o SiO₄⁴⁻ reemplazando al PO₄³⁻ en la red cristalina. Estas sustituciones se encuentran en la naturaleza en forma de trazas, pero para ciertos iones se han observado sustituciones completas.

Entre las apatitas sintéticas se pueden generar distintos tipos de vacancias o estructura y tamaño de cristales según el método de síntesis utilizado. Estos métodos incluyen: síntesis en fase sólida^I, por vía de sol-gel^{II}, por procesos hidrotérmicos ^{III,IV}, con irradiación de microondas^{V,VI,VII}, o fusión de precursores sólidos a altas temperaturas, entre otras.

Entre las diferentes apatitas es de particular importancia la fase hidroxiapatita, $Ca_{10}(PO_4)_6$ (OH)₂ (HAp) debido a su similitud química y estructural con la principal fase mineral constituyente del hueso y dientes en los vertebrados^{VIII}, lo cual sugiere su uso potencial como promotora del crecimiento óseo asignándosele una biocompatibilidad intrínseca ^{IX,X,XI,XII,XIII}. Últimamente se ha comenzado a dirigir el

interés hacia el estudio de hidroxiapatitas modificadas involucrando especies que se encuentran en trazas en el organismo^{XIV} ya que estas sustituciones pueden modificar sus propiedades mecánicas y solubilidad así como también su capacidad de unirse al hueso^{XV}. El anión fluoruro es una de estas especies que se encuentra en pequeñas proporciones en la fase mineral del hueso y los dientes y sólo es necesario pequeñas cantidades de flúor exógeno para promover la cristalización de la fluorhidroxiapatita (FHAp) mediante la sustitución del anión F⁻ en las posiciones del anión OH⁻ en la red cristalina generando la composición Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ - _x(F)_x. Esta fase es mecánica y químicamente más resistente^{XVI, XVII} que la hidroxiapatita y se ha comenzado a evaluar como un posible material biomédico alternativo.

Se ha investigado el crecimiento y la cinética de formación de cristales de fluorapatitas en soluciones que contienen concentraciones estequiométricas de los iones involucrados en la red cristalina. Sin embargo, *in vivo*, el promedio de las concentraciones de iones es generalmente no estequiométrico y las apatitas biológicas presentan estequiometrías y fases variables.

Asímismo, la formación de apatitas heterogéneas con alto contenido de flúor puede generar el crecimiento de cristales de CaF_2 y producir efectos adversos como el incremento en la fractura de los cristales^{XVIII}.

La síntesis de apatitas puras con estructura y composición reproducibles es un proceso complejo debido a la gran variedad de fases de fosfatos de calcio que pueden obtenerse. Por ejemplo las fases CaHPO₄.2H₂O (calcio-fosfato dihidratado, DCP), Ca₈(HPO₄)₂(PO₄)₄.5 H₂O (octacalciofosfato, OCP), Ca₃(PO₄) ₂ (beta-tricalciofosfato, $\tilde{\beta}$ TCP) no son termodinámicamente estables pero pueden actuar como precursores de la fase más estable con una cinética de formación más rápida. Estos precursores poseen fases cristalinas y relación molar Ca/P (parámetro de biocompatibilidad) muy diferentes a la HAp.

Según el método de síntesis pueden generarse también subproductos tales como CaO (áltamente tóxico)^{XIX} o fases de HAp carbonatada (sustitución de CO_3^{2-} por PO_4^{3-}) que se encuentra presente en precipitaciones biomiméticas y pueden generar distorsiones en la red cristalina modificando la solubilidad y el tamaño de cristales aun cuando este efecto no siempre es indeseable^{XX}, .

La sustitución parcial de OH⁻ por F⁻ genera distintos tipos de distorsiones de red cristalina, distorsión que desaparece cuando la sustitución es completa (100%) generando apatitas cada vez más estables.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se utilizaron dos métodos diferentes de síntesis: *a*) el método biomimético^{XXII} (para obtener hidroxiapatita, HAp con x = 0) y *b*) el método de precipitación selectiva a flujo controlado y pH básico. Este último método fue el utilizado para preparar las fluorhidroxiapatita con distinto grado de sustitución (FHAp con $0 \le x \le 2$). Posteriormente se realizó el estudio de la eficiencia de la sustitución así como de sus propiedades y características fisicoquímicas a fin de poder utilizar este producto de síntesis como biomaterial.

Método biomimético

Esta síntesis en fase homogénea consiste en la preparación de una solución sobresaturada de fosfato de calcio disolviendo NaCl, CaCl₂ y Na₂HPO₄. a pH 7,4 en medio de TRIS/HCl, que se mantiene durante 7 días termostatizada a 37°C. El proceso se completa con una filtración a presión reducida, secado de los cristales y un posterior tratamiento térmico. Hemos aplicado diferentes programas de calentamiento con dos temperaturas finales de calcinación (200 y 900°C) con el propósito de estudiar el efecto de la temperatura en las características de los cristales.

Síntesis de hidroxi-fluorapatitas mediante precipitación selectiva

Se adiciona $(NH_4)_2HPO_4$ a velocidad de elusión controlada en un recipiente de polipropileno cerrado conteniendo Ca $(NO_3)_2.4H_2O$. el pH del sistema se mantiene en 9.2 ± 0.1 con un titulador automático 665 Dosimat (Metrohm Switzerland) mediante el agregado de NH_4OH y con un purgado continuo con N_2 (g) para evitar posibles sustituciones de $PO_4^{3^2}$ por aniones CO^{3^2} .

Una vez finalizado el agregado de reactivo la reacción se mantiene en forma controlada durante 24 hr (agitación, control de pH y burbujeo de N_2). Posteriormente se deja la solución en reposo y se procede a separar el precipitado por filtración a presión reducida seguido de una etapa de secado de cristales.

Variando la concentración de NH₄F agregado a la solución de fosfato se produce la sustitución sucesiva desde el 0% (OHAp) al 100% (FAp) pasando por distintas composiciones de hidroxi-fluorapatita.

Las muestras obtenidas por este método fueron sometidas a las mismas rampas de calentamiento descriptas en el método de síntesis biomimético.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los materiales obtenidos

Difracción de Rayos X

El análisis estructural de las apatitas se realizó mediante la obtención de sus respectivos patrones de difracción de rayos X.

La Figura 1 presenta los difractogramas obtenidos para la OHAp (1a) y FAp (1b) sintetizadas por el método de precipitación selectiva . En ambas mustras se puede observar un incremento en el grado de cristalinidad con el aumento de la temperatura final de sinterizado, así como la inclusión de fluoruros en la



red cristalina. Los difractogramas obtenidos para el producto de la síntesis biomimética arrojaron los mismos resultados.

Se realizaron refinamientos Rietvelt a partir del modelo tomado de la base de datos ICSD para la OHAp pura, lográndose un buen ajuste de los patrones de difracción de las muestras obtenidas respecto de los patrones de referencia, tanto para OHAp y FAp. Se realizó el análisis de la coexistencia de otras fases de fosfatos de calcio precursoras de OHAp y FAp sin observar posiciones de Bragg compatibles con esas fases.

Figura 3

La Figura 2 muestra la ampliación de la zona de reflexión del plano (310), observándose un patrón característico de sustitución total de Fincluido en la red. La ausencia de reflexiones típicas para el CaO en ambas apatitas indica que este contaminante, producto de reacciones incompletas, tampoco es detectado dentro del límite de la técnica.

Tanto la OHAp como la FAp cristalizan en un arreglo hexagonal, grupo espacial P6₃/m y las pequeñas variaciones obtenidas en los parámetros de celda debido a la sustitución completa con F⁻ (FAp) son coincidentes con los informados en bibliografía^{XXIII} y no producen distorciones significativas en la morfología general de la FAp respecto de la OHAp (Figura 3).





A partir de la diferencia de intensidad de la difracción observada para algunos planos cristalinos, respecto del modelo refinado para la OHAp y FAp, se concluyó que en las apatitas sintetizadas existe un crecimiento preferencial de los cristales perpendicular al plano (100) en la dirección del eje c de la celda unidad como se esquematiza en la Figura 3.

Determinación de tamaño de cristales por DRX

En la determinación del tamaño de cristales a partir de los difractogramas se utilizaron los anchos de los picos correspondientes a los planos cristalinos (002), (102), (222) y (040) (Tabla 1), aplicando la ecuación de Scherrer.

Esta ecuación relaciona el ancho del pico $\Delta(2\Theta)$ en la mitad del máximo de la intensidad de difracción de los planos seleccionados, con la longitud de onda incidente (λ), correcciones de instrumetal y el tamaño del cristal (D) de la siguiente forma:

 $\Delta(2\Theta)=0.9\lambda / (D \cos(2\Theta)).$



El promedio del tamaño de los cristales de FAp es mayor que el de los cristales de OHAp como lo observa Rodriguez-Lorenzo y col^{XXIII} para el método de síntesis por precipitación selectiva.

El aumento de cristales con la temperatura es un efecto esperado y estos van creciendo a lo largo del eje *c*.

Analisis de la morfología superficial de los cristales por SEM

La morfología de los polvos sintetizados fue analizada por microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un equipo LEO 1450 VP EDAX, mediante la técnica combinada SEM-EDS .

La Figura 5 muestra una imagen de un aglomerado de un tamaño representativo del promedio de los aglomerados observados de entre 10 y 20 μ m formados por el agregado de cristales individuales de hidroxiapatita biomimética. La barra indicada al pie de la microfotografía representa 2 μ m por lo que es posible estimar que el tamaño del cristal crecido de forma laminar es de aproximadamente 300 nm. La morfología presentada por estos cristales posee características típicas de hidroxiapatita.



El espectro EDS tomado sobre este aglomerado muestra un pico de Ca a energías superiores al pico de P y de mayor intensidad. A partir de esta técnica no es posible determinar con precisión la relación molar Ca/P debido la falta de calibración del instrumental. A pesar de esto un análisis semicuantitativo arrojó una relación Ca/P = 1,8 lo que sugiere que la reacción de síntesis de $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ se ha completado exitosamente (Ca/P teórica= 1,67).

Las imágenes obtenidas para las fluorapatitas (Figura 6) muestran la formación de agregados globulares de tamaños menores a la HAp de hasta 4 μ m en tanto que los cristales son de hábito aproximadamente esférico y de tamaño ~ 100 nm del orden de magnitud al obtenido mediante la ecuación de

Scherrer. El tipo de metalizado realizado sobre las muestras de FAp para la microscopía SEM (depósito de una delgada película de Au, a diferencia del metalizado por sputtering de C realizado a las muestras de HAp) impidió realizar espectros EDS para determinar la composición química de la muestra. Se encuentra en proceso un estudio de análisis químico de las muestras obtenidas con distinto grado de sustición.





CONCLUSIONES

• Los patrones de DRX revelan estructura de apatita. El refinamiento Rietvelt del modelo a partir de base de datos de HOAp y FAp presenta patrones con un muy buen ajuste.

Una vez encontradas las condiciones óptimas de síntesis, no se han detectado fases adicionales a las de hidroxi o fluorapatita. La estructura de la celda es la misma para ambas apatitas con muy pequeñas variaciones en los parámetros de celda que coinciden con bibliografía y no producen distorsión de la celda.

- Se observó un aumento del tamaño de los cristales a lo largo del eje c con el aumento de la temperatura de calcinado para todas las apatitas sintetizadas.
- Se observó un aumento de la cristalinidad tanto con la temperatura como con la inclusión de F en la red cristalina.
- Con el objetivo de analizar la acción promotora de crecimiento óseo, en nuestro laboratorio se encuentra en desarrollo un estudio sistemático de modificación de superficies de TiO₂ con HOAp sintetizadas según los métodos descriptos y se observó que el tipo de depósito formado es altamente dependiente del pretratamiento superficial.

REFERENCIAS

- xx L. García Rodenas, J.M. Palacios, M.C. Apella, P.J. Morando, M.A. Blesa, Journal of Colloid and Interface Science 290 (2005) 145–154
- ^{XXI} M. Stigtera, K. de Groota, P. Layrollea, Biomaterials 23 (2002) 4143–4153

¹B.O. Fowler, Inorg. Chem. 13 (1974) 207

^{II} M. Vallet-Regi, M.T. Gutierrez-Rios, M.P. Alonso, M.I. de Frutos, S. Nicolopoulos, J. Solid State Chem. 112 (1994) 58.

^{III} H. Hattori, Y. Iwadate, J. Am. Ceram. Soc. 73 (1990) 1803.

^{IV} M. Yoshimura, H. Suda, K. Okamoto, K. Ioku, J. Mater. Sci. 29 (1994) 3399.

^V E. Lerner, S. Sarig, R. Azoury, J. Mater. Sci., Mater. Med. 2 (1991) 138.

VI B. Vaidhyanathan, K.J. Rao, Bull. Mater. Sci. 19 (1996) 1163.

VII T.S. Sampath Kumar, I. Manjubala, J. Gunasekaran, Biomaterials 21 (2000) 1642.

VIII FCM Driessens. Journal of Biosciences 1980;35(5-6):357-62.

^{IX} M Jarcho. Clin Orthop 1981;157:259–78.

^x M. D Roy, Linnehan SK. Nature 974;247:220–2.

XI HC Cameran, I Macnab, RM Pilliar. J Biomed Mater Res 1977;11:179–86.

XII E. Tsuruga, H. Takita, H. Itoh, Y. Wakisaka, Y. Kukoki J Biochem 1977;121:317-24.

XIII K. de Groot, C. de Putter, P. Smitt, Driessen Sci.Ceram. 1981;11:433–7.

XIV L.M. Rodríguez-Lorenzo, J.N. Hart, K.A. Gross. Biomaterials 24 (2003) 3777-3785

^{XV} JE. Tyler Caries Res 1970;4(1):23-30.

^{XVI} J. Lucas J.Fluor Chem 1988;41:1–8.

XVII MJ Larsen, SJ.Jensen Arch Oral Biol 1994;39(1):23–7.

XVIII Demos LL, Kazda H, Cicuttini FM, Sinclair MI, Fairley CK. Aust Dental J 2001;46(2):80-7.

xix Hossein Eshtiagh-Hosseini, Mohammad Reza Housaindokht, Mohammad Chahkandi. Materials Chemistry and Physics 106 (2007) 310-316

XXII Qiyi Zhang, Yang Leng, Renlong Xin. Biomaterials 26 (2005) 2857–2865

XXIII L.M. Rodríguez-Lorenzo, J.N. Hart, K.A. Gross. J. Phys. Chem., 2003, Vol 107, pp 9316-8320.