

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LA HIDROXIAPATITA NATURAL OBTENIDA DEL HUESO DE CERDO

Juan Camilo Orozco Cardona^{1}, Iván Marino Zuluaga¹, Paola Andrea Forero Sossa¹, Pedro José Arango Arango¹, Elisabeth Restrepo Parra^{1,2}.*

¹ Laboratorio de física del plasma Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, Colombia

²PCM Computational Applications Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, Colombia

*Contacto: jcorozcoc@unal.edu.co

RESUMEN

En este trabajo se sintetizaron polvos de hidroxiapatita (HA) a partir de fosfato de calcio amorfo obtenido de la diáfisis del fémur de cerdo con una edad de sacrificio aproximada de 6 meses, empleando un proceso de desproteización por medio de cocción y limpieza con ácido oxálico. Posteriormente, el material es pulverizado mediante un molino de bolas y tamizado adquiriendo un tamaño de grano aproximadamente de 38 μm . En la etapa final de la sintetización se realizó un proceso de calcinación a temperaturas de: 800°, 1000° y 1200° C aplicando rampas de temperatura de 10°C por minuto para evitar la desestabilización del material.

Los materiales, caracterizados por medio de difracción de rayos-X (XRD), mostraron que a 800 y 1000°C se observan los picos característicos de las fases cristalinas de HA; sin embargo, para el caso de la muestra producida a 1200°C, la HA presentó una transformación a la fase β -trifosfato de calcio amorfo (β -TCP).

Utilizando espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se observó la presencia de los grupos hidroxilos y óxidos de fosfato característicos de la hidroxiapatita

Palabras clave: *Hidroxiapatita, Hueso femoral de cerdo, Fosfato de calcio*

ABSTRACT

In this work were synthesized hydroxyapatite (HA) powders by using amorphous calcium phosphate obtained from the femoral shaft of pigs with a slaughter age of approximately 6 months. It was employed a process of deproteinization through cooking and cleaning with oxalic acid. Afterwards, the material was pulverized by using a ball mill and sieved with the aim to obtain a grain size of around 38 μm . In the final stage of the synthesis, calcination processes at a temperature of 800°, 1000° y 1200° C were carried out by applying increases of 10°C per min in order to avoid the material destabilization.

Materials characterized by X-ray diffraction (XRD) showed at 800 °C and 1000 °C characteristic peaks of the crystalline phases of HA, however, when the sample was produced at 1200 °C, the HA was converted to the β phase of amorphous calcium triphosphate (β -TCP).

It was observed the presence of hydroxyl groups and phosphate oxides by using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

Keywords: *Hydroxyapatite, Pig femur bone, Calcium phosphate*

1 INTRODUCCIÓN

La HA con fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, es el principal constituyente inorgánico de los tejidos óseo y dental. Por este motivo, este material ha sido empleado como biomaterial o como uno de los componentes de biomateriales compuestos, destinados a reparaciones o sustituciones óseas. La HA puede obtenerse a partir de huesos humanos o de otra especie animal, por transformación de materiales naturales como los esqueletos minerales de los corales, equinodermos y bovino o puede ser sintetizada artificialmente. Dependiendo del origen y del método de síntesis, resultarán materiales con gran variabilidad físico-química y morfológica. Por estas razones, pueden obtenerse distintas composiciones de HA para satisfacer los requisitos de aplicaciones clínicas específicas [1].

Al procesar HA de manera artificial a partir de precursores químicos como los nitratos del calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y los fosfatos de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{HP}_2\text{O}_7$, se logra obtener la composición química de la HA; sin embargo, la cristalinidad presente en la estructura es poca. Si las proporciones Ca/P son aproximadas a 1,60 se obtienen una HA deficiente en calcio lo que provoca la formación trifosfatos de calcio (β -TCP y α -TCP), sin embargo, no exhiben las capacidades bioactivas y de osteointegración características de la HA [2, 3,4].

La HA obtenida a partir de transformación de materiales naturales, como lo es la HA extraída del cerdo evidencia proporciones estándares Ca/P = 1,67 con estructuras altamente cristalinas, y tamaño de poro menor que las diferentes fuentes animales y sintéticas indicando menor superficie de contacto y por lo tanto menor degradación [4]. Siendo un proceso altamente repetible, conservando la misma composición química en cada una de la sintetizaciones [5].

Las aplicaciones del material son varias y es altamente utilizado en las áreas de la medicina debido a la propiedad de actuar como revestimiento de la superficie de implantes ortopédicos y dentales de metal; El papel de los recubrimiento de HA es doble: el primero es la osteointegración promoviendo la formación de tejido óseo en la superficie del implante y la reducción de iones metálicos liberados, al actuar como una barrera física [2]

Esta investigación se llevó a cabo con el objetivo de obtener polvo de HA para futuras pruebas biológicas y aplicaciones biomédicas, estableciendo un método en la obtención de la HA más eficiente, que represente un menor costo en la producción teniendo en cuenta que el hueso de cerdo es un material más abundante y económico que los precursores químicos para su producción sintética.

2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

La síntesis de HA se inició a partir de hueso de cerdo con edad de sacrificio de aproximadamente seis meses. Debido a que el hueso se encuentra conformado de una fase orgánica compuesta por

proteínas, lípidos, agua y entre otros, se realizó un proceso de desproteinización con el fin de retirar toda esta materia orgánica.

Inicialmente, se emplearon 6 kg de hueso femoral de cerdo. La etapa de desproteinización consistió en lavar y cocinar el hueso por una hora en olla exprés en la cual se introdujeron 4 huesos de la parte femoral del cerdo; posteriormente se desecharon las rótulas, membranas lipídicas y tejidos, reservando la parte del hueso correspondiente a la diáfisis o hueso compacto y conservando 1,9 kg de diáfisis. El material resultante se trituró extrayéndole la médula y realizando un lavado de manera convencional. El producto lavado es llevado a horno microondas con una potencia de 700 W para permitir la cocción en agua durante 30 min y separar los lípidos restantes del hueso. Se realizaron 5 repeticiones, teniendo cuidado de reemplazar el agua de la cocción en cada proceso. El paso final del proceso de cocción se realiza sin agua con fin de secar el producto.

El proceso anterior de lavado en el microondas no eliminó toda la componente orgánica y lipídica, por lo que fue necesario realizar cinco procesos de lavado más en el horno con agua y detergente convencional cada uno de ellos durante 30 min y cambiando el agua con detergente cada vez que se realizó el proceso de lavado. El sucesivo proceso de cocción se realiza durante 22 minutos sin agua con fin de secar el producto.

Una vez terminados los dos procesos de lavado anteriores se realizó un lavado con ácido oxálico ($H_2C_2O_4$) [6,7], durante 2 h con agitación magnética, con fin de blanquear la superficie del hueso triturado. Una vez transcurridas las 2 h se lavó con 300 ml de agua destilada. Nuevamente se lavó con ácido oxálico durante 30 minutos en agitación magnética, dejando actuar el ácido durante hora y median más; reiteradamente se enjuaga con 300 ml de agua destilada.

Terminadas las etapas de lavado con el ácido oxálico se realizaron dos repeticiones de secado durante 15 minutos sin agua en microondas. Finalizado todo el proceso de secado, la masa de hueso que se conservó fue de 634.83 g. El aspecto de las astillas de hueso después de proceso de secado se muestra en la figura 1(a).



Figura 1. (Izquierda) Astillas de huesos de cerdo después de haber sido sometidas a sucesivos procesos de lavado y (b derecha) polvo fino de hueso de cerdo después de continuos proceso de molido

Con el fin de obtener un polvo fino y maleable se tomaron los trozos de hueso ya secos y limpios y se realizaron procesos de molienda mediante un molino de bolas de acero inoxidable 304, con dimensiones de 16 cm de alto y con un diámetro de 15,5 cm, con cilindros de diferentes dimensiones desde 28,5 mm hasta 32 mm y un diámetro de 31,6 mm dependiendo del tamaño del grano de las astillas de hueso. La molienda se realizó con la relación de peso de 1 g de astillas de hueso por cada 10 g de acero en bolas, hasta obtener un polvo fino con un grano promedio de 38 μm como se muestra en la figura 1(b).

El proceso final de síntesis se realizó mediante un tratamiento térmico que inicia a temperatura ambiente hasta 800°C (HAC1), 1000°C (HAC2) y 1200° C (HAC3), con una rampa de temperatura de 10°C por minuto, manteniendo la temperatura límite durante 24 h, con el fin de determinar la influencia de la temperatura en la formación de los cristales y enlaces característicos de la HA.

Las caracterizaciones estructurales se realizaron mediante difracción de rayos X (XRD) en un equipo RIGAKU, MINIFLEX II, con ánodo de cobre ($k_{\alpha} = 1.5406\text{Å}$) utilizando un voltaje de 30kV y un tamaño de paso 0.020° en 2θ .

Las caracterizaciones composicionales se realizaron mediante transformada de Fourier en el infrarrojo (FT-IR) en un equipo Spectrum BX-II.

2.1 RESULTADOS Y ANÁLISIS

En la figura 2 se presentan los difractogramas de las muestras producidas a 800°C (HAC1), 1000°C (HAC2) y 1200°C (HAC3) con el fin de identificar los picos característicos de la estructura cristalina hexagonal compacta correspondiente a la HA. Se encontró que las muestras producidas a (HAC1) y a (HAC2) evidenciaron la estructura correspondiente de la HA con orientación presencial en el plano (211); sin embargo, a 1200°C (HAC3) la estructura hexagonal compacta característica del material se pierde por completo, generando las fase beta trifosfato de calcio β -TCP y alfa trifosfato de calcio α -TCP, que se considera como HA deficiente el calcio, con proporciones Ca/P ~1.50. Según la literatura, está fase no cumple con las cualidades de un material bioactivo [1,3,4], demostrando que la cristalinidad del material es dependiente de la temperatura a la cual se efectuó el tratamiento térmico [7]. Este cambio en la estructura cristalina del material se debe a la deficiencia de calcio en la estructura.

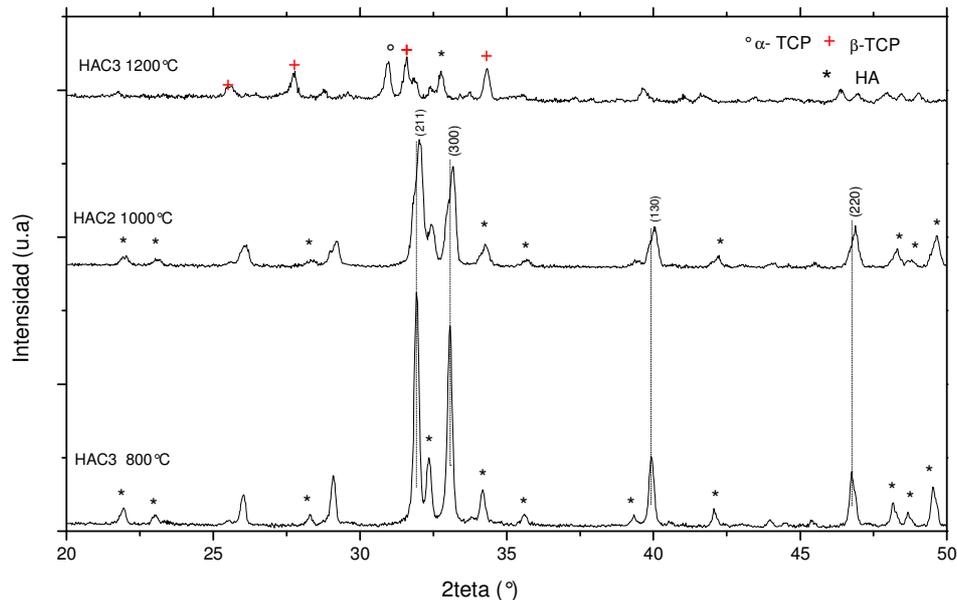


Figura 2. Difractogramas de las muestras producidas de HA a 800°C (HAC1), 1000°C (HAC2) y 1200°C (HAC3)

Las caracterizaciones correspondientes a la composición química de las muestras HAC1, HAC2 y HAC3 se realizaron mediante la técnica de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) como se muestra en la figura 3, con el fin de encontrar los grupos funcionales correspondientes a la HA. En estos espectros se observó que en las tres muestras se encuentran presente los modos vibracionales de las bandas correspondientes a los grupos fosfatos (PO_4) en los picos dentro del rango comprendido entre 950 y 1100 cm^{-1} , al grupo hidroxilo (OH) en los picos cercanos a 634 y 3600 cm^{-1} y al grupo carbonato (CO_3) en los picos cercanos a 874 y 1431 cm^{-1} , característicos de la HA estequiométrica. Esto demuestra que el material sintetizado corresponde a la HA de origen animal que se estaba buscando; sin embargo, en la muestra (HAC3) se puede observar la pérdida del grupo (OH), además se presenta la disminución de la transmitancia correspondiente a los grupos (PO_4), puesto que por el aumento de temperatura provoca la liberación de agua de la muestra HAC3 y deficiencia de calcio desestabilizando la estructura cristalina y destruyendo los enlaces característicos de la HA.

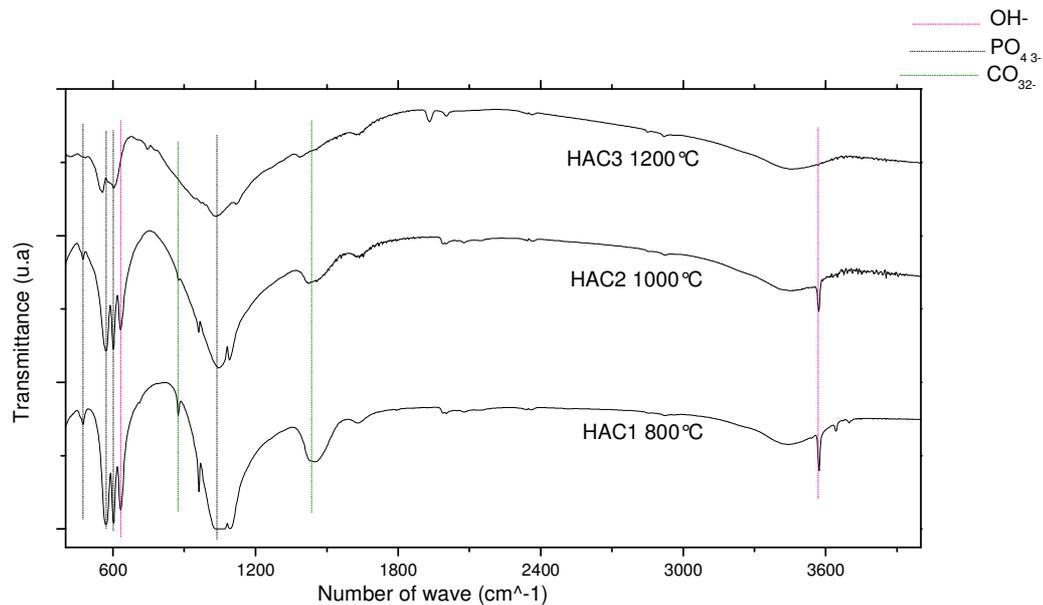


Figura 3. Espectros FTIR de las muestras producidas de HA a 800°C (HAC1), 1000°C (HAC2) y 1200°C (HAC3)

3 CONCLUSIONES

Se obtuvo HA de fuente animal de las muestras tratadas a 800°C y 1000°C donde su obtención fuera de bajo costo con material de alta cristalinidad y la presencia de los grupos funcionales característicos de la HA estequiometrica. Observando que las muestras tratadas a 1200°C se desestabilizan por completo perdiendo la estructura cristalina característica de la HA, generando β -TCP, además se dejan presentar las bandas correspondientes a los modos vibracionales OH propios de la HA, además se observa una considerable disminución de las bandas correspondientes a los modos vibracionales PO₄.

La eficiencia de la masa del material en su sintetización está por debajo del 5%, ya que el proceso se inició con 6000 gr de hueso femoral de cerdo y culminó con menos de 310 gr de hidroxiapatita natural de cerdo.; los cuales son dependientes del proceso de calcinación y molienda.

4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Seckler, M. M., Carrodegua, R. G., Derenzo, S., Giuliatti, M., Y Rodríguez, R. Técnicas de obtención de hidroxiapatita y otros fosfatos de calcio. II Curso sobre biomateriales para aplicaciones odontológicas y traumatológicas. Cartagena de Indas, 1998.
2. Lazic, S., Zec, S., Miljevic, N. Y Milonjic, S., "The Effect of Temperature on the Properties of the ha Precipitated From Calcium Hydroxide and Phosphoric Acid", *Thermochimica Acta*, Vol. 374 No. 1, 13-22, 2001.

3. Kannan, I.A.F. Lemos, J.H.G. Rocha Y J.M.F. Ferreira, “Synthesis and characterization of magnesium substituted biphasic mixtures of controlled hydroxyapatite/b-tricalcium phosphate ratios”, *Journal of Solid State Chemistry*, Vol. 178, No. 1, 3190–3196, 2005.
4. Pizá Vallespir G. Clavos de Fijación Externa Recubiertos con Hidroxiapatita, Tesis de Doctorado en medicina y cirugía, Barcelona (España) Ed: Universidad Autónoma de Barcelona, 2001.
5. Hernández, R., Palma, R., Piña, M.C. “Hidroxiapatita y sus aplicaciones”, *revista mexicana de física*, Vol. 45 No 1, 144-147, 1999.
6. Ospina, I.D., Naranjo, D.M., Ficha técnica ácido oxálico, distribuidora de químicos industriales S.A. 2006.
7. Jaramillo, C.D., Rivera, J.A., Echavarría, A., O’Byrne, J., Congote, D., Restrepo, L.F., “Comparación de las Propiedades de osteoconducción y osteoconducción de una hidroxiapatita reabsorbible comercial con una hidroxiapatita reabsorbible sintetizada”, *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, Vol. 22 No 1, 117-131, 2009.