

## HYDROXYAPATITE SYNTHESIS ON MESOPOROUS SILICA: A HIGH RESOLUTION ELECTRON MICROSCOPY STUDY.

D. R. Acosta <sup>a,\*</sup>, A. Díaz-Cuenca <sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 20-2364, 01000 MEXICO D.F.

<sup>b</sup>Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla (Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) – Universidad de Sevilla), Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja, Av. Americo Vespucio no. 49, 41092 Sevilla, España.

<sup>c</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), España.

\*Corresponding authors, e-mail: [dacosta@fisica.unam.mx](mailto:dacosta@fisica.unam.mx), phone: +55 56225117;  
[aranzazu@icmse.csic.es](mailto:aranzazu@icmse.csic.es), phone: +34 954489542.

Recibido: Diciembre 2010. Aprobado: Mayo 2011

Publicado: Mayo 2011

### ABSTRACT

The synthesis of hydroxyapatite on mesoporous silica SBA-15 material and the resulting composite, after a specific thermal treatment, has been followed and studied by electron microscopy. After the synthesis the samples were undergone a double thermal treatment: First the samples were hydrothermally treated from 353 y 393 K in a 10 K range interval during 24 hours; after filtering and drying the materials had a second treatment at 773 K in air during 10 h. The samples were studied using scanning, analytical and transmission electron microscopy. Also STEM and high resolution electron microscopy (HREM) techniques were used to follow the structural evolution at the nanoscale after each thermal treatment. The growth of hydroxiapatite along the tunnels of the mesoporous silica was observed after thermal treatment at 60 and 80 °C being increased with the hydrothermal treatment temperature.

**Keywords:** Hydroxyapatite, bioceramics, HREM, mesoporous silica, nanostructured materials.

### SINTESIS DE HIDROXIAPATITA EN SILICA MESOPOROSA: UN ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE ALTA RESOLUCION

#### RESUMEN

En este trabajo se presentan resultados de la síntesis de hidroxiapatita (HA) en sílice mesoporosa SBA-15. Se ha hecho un estudio de la síntesis de ambos materiales y un seguimiento del efecto del doble tratamiento térmico posterior a la síntesis. Las muestras se sometieron a distintas temperaturas de tratamiento hidrotermal entre 353 y 393 K con incrementos de 10 K durante 24 horas. En cada caso y una vez filtrado y seco el material se volvió a tratar con una calcinación a 773 K durante 10 hs. Se presentan los resultados del estudio del material compuesto SBA-15-HA por microscopía electrónica de transmisión convencional y avanzada (STEM, Contraste Z, HREM). El crecimiento de HA en los túneles de la matriz de sílice mesoporosa y el nivel de ocupación de los mismos aumenta con la temperatura del primer tratamiento hidrotermal y también del segundo tratamiento que favorece el sinterizado dentro de los túneles.

**Palabras clave:** Hidroxiapatita, biocerámicas, HREM, sílice mesoporosa, materiales nanoestructurados.

#### INTRODUCCION

La hidroxiapatita (HA) sintética es usada en forma intensa en el campo de los biomateriales, dado su alto grado de biocompatibilidad y propiedades osteoconductoras [1-4]. La necesidad de una mayor eficiencia, funcionalidad y sinergia con los materiales biológicos, lleva a la búsqueda y desarrollo de nuevos

biomateriales que puedan servir en diversos tratamientos en biomedicina y medicina regenerativa.

La HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , presenta una estructura cristalina hexagonal con parámetros  $a = b = 0.9432 \text{ nm}$  y  $c = 0.6881$ . Este mineral es el componente principal del tejifo en huesos y dientes. En la actualidad existe un gran interés en la búsqueda y optimización de procesos de síntesis de HA en materiales y productos avanzados y

económicamente viables que permitan su incorporación en procesos quirúrgicos poco invasivos y de aplicación en terapias de regeneración e ingeniería de tejidos. La ingeniería tisular en hueso requiere de la utilización de materiales soporte o andamios que sirvan de sostén estructural y que además induzcan la osteogénesis. Los huesos están formados fundamentalmente por una matriz de proteína de colágeno, agua y nanopartículas de HA de baja cristalinidad con una relación Ca/P entre 1.67 y 1.5. En este sentido se han realizado esfuerzos para obtener composites por síntesis o nucleación y crecimiento de la fase mineral sobre biomoléculas o plantillas orgánicas como una primera aproximación biomimética [5-6]. Una estrategia alternativa al uso de estas plantillas orgánicas para intentar el control de crecimiento cristalino de forma jerárquica puede ser la utilización de sólidos inorgánicos mesoporosos [7].

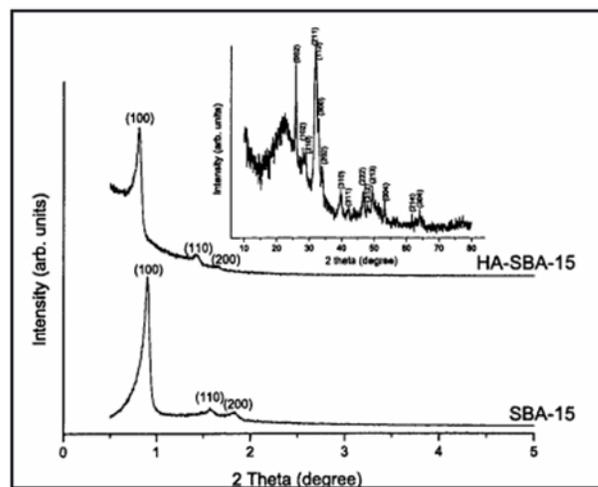
## MATERIALES Y MÉTODOS

### Síntesis del material SBA-15-HA

Las muestras se prepararon en dos etapas: En primer lugar se obtuvo una matriz de sílica dopada con calcio [7]. Brevemente, el copolímero en bloque P123 fue disuelto en una solución acuosa conteniendo HCl y  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 313 K. Tetraetil ortosilicato (TEOS) fue usado como precursor de la sílice. La mezcla se mantuvo en agitación durante 24 horas y se secó en una estufa a 353 K. En la segunda etapa, realizada a valores de pH básico se indujo la cristalización de la fase de HA. La sílice dopada con calcio se puso en contacto con una solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y se sometió a un segundo tratamiento hidrotérmal a 353, 363, 373, 383, 393 K respectivamente otras 24 horas. El material particulado obtenido se lavó y se calcinó en aire a 773° K durante 10 h. La caracterización estructural de HA-SBA-15 se llevó a cabo por difracción de rayos X, y por microscopía electrónica de barrido y de transmisión en sus modalidades de TEM convencional, HREM y de STEM.

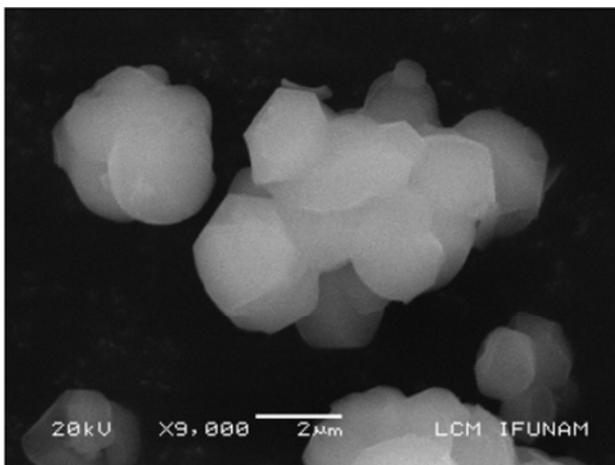
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se presentan los difractogramas de rayos X de las muestras de sílice SBA-15 y de uno de los materiales composite sintetizados HA-SBA-15 utilizando el tratamiento hidrotérmal a 393 K. Para el caso del material de sílice pura, sin HA, se observan las reflexiones de difracción correspondientes a las distancias de 9.8, 5.6 y 4.8 nm para la SBA-15. En el caso del material compuesto HA SBA-15 también se observan estas reflexiones con los valores de 10.6, 6.2 y 5.3 nm. En ambos casos las reflexiones de (100), (110) y (220) se han indexado para una estructura hexagonal bidimensional resultado unos parámetros de red  $a$  de 11.2 y 12.4 nm respectivamente. Estos resultados confirman que el crecimiento de los cristales de HA se realiza sin menoscabo de la nanoestructura mesoporosa aunque hay algunas alteraciones menores, como se refleja en las variaciones de los parámetros de red observados. Por otra parte el diagrama de difracción completo del material composite indican la formación de la fase HA como única fase cristalina.



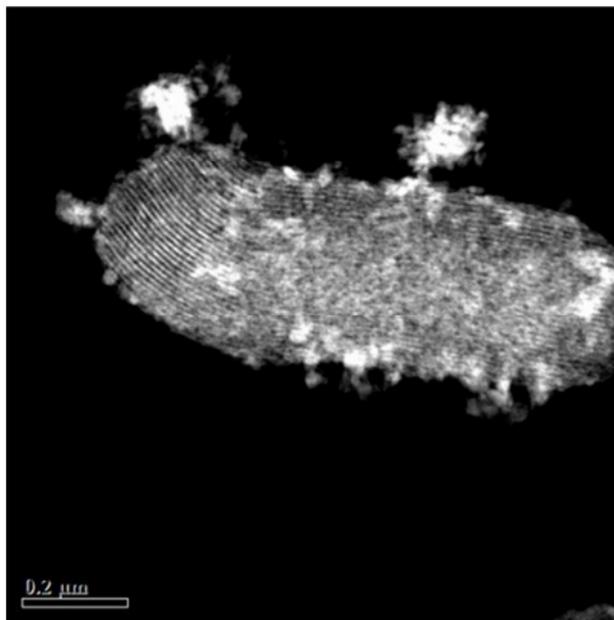
**Fig 1.** Diagramas de difracción de ángulo bajo de las muestras SBA-15 y del composite HA-SBA-15 obtenido mediante el tratamiento hidrotérmal a 393 K. El recuadro de la parte de arriba recoge el difractograma completo para el HA-SBA-15 mostrando los picos de difracción correspondientes a la fase de HA.

Por microscopía electrónica de alta resolución, se realizó el estudio para todos los materiales compuestos obtenidos utilizando las distintas temperaturas de tratamiento hidrotérmal en el intervalo entre 353 y 393°K. Se han considerado los efectos sobre la mesoestructura del material en los aspectos de tamaño de poro, forma y anchura de las paredes de la sílice.

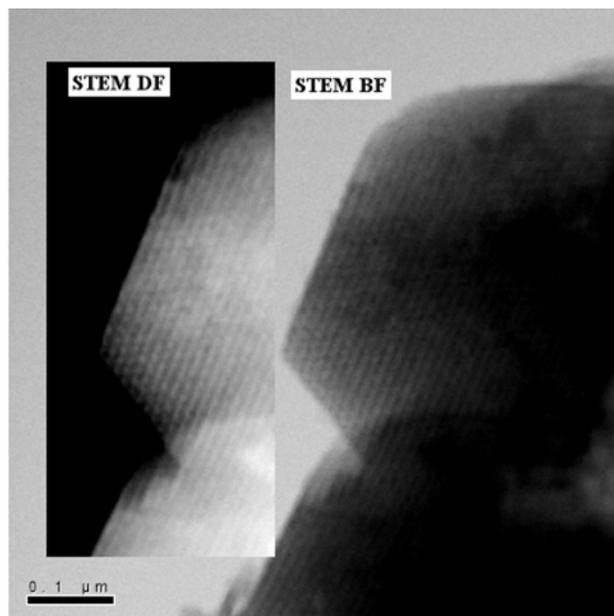


**Fig 2.** Micrografía SEM de las partículas de material de sílice SBA-15.

En la figura 2 se presenta una micrografía de microscopía de barrido de partículas constituyentes del material de sílice SBA-15 donde se aprecia su morfología facetada. La formación de HA en las diferentes condiciones experimentales no produce la pérdida de los canales mesoporos ordenados como se ilustra en la figura 3. En la figura 4 se muestra un par micrografías de STEM en los modos de campo oscuro y campo claro de la misma zona de la muestra tratada a 373 K. Es muy notable en la imagen del lado izquierdo y por el alto contraste proveniente de los mesoporos de que éstos, están ocupados por la hidrotalcita. Para muestras con las temperaturas de tratamiento hidrotérmal más bajas, la HA parece formando agregados de partículas más desordenados que para los materiales tratados a mayor temperatura donde se ha observado mayor ordenamiento en y sobre la matriz mesoporosa.

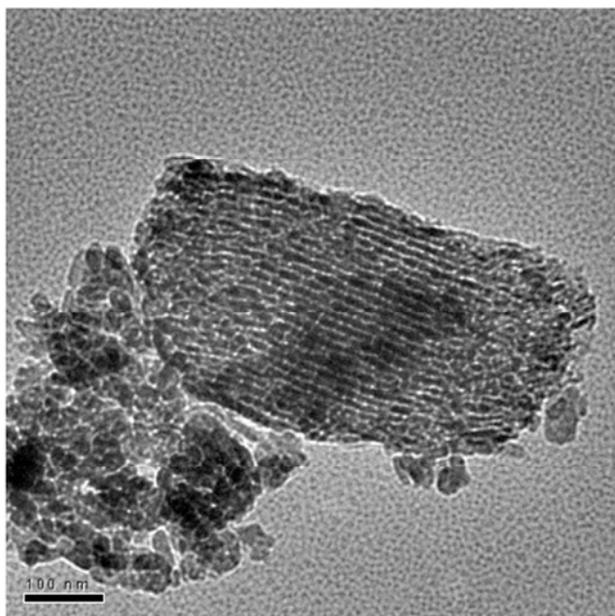


**Fig 3.** Micrografía de STEM en campo oscuro de la muestra tratada a 373 K con resolución de los canales mesoporos parcialmente ocupados por la fase de HA que se observa con un contraste más claro.



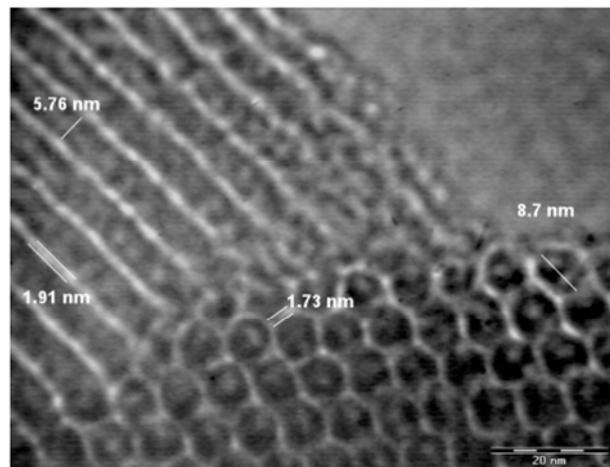
**Fig 4.** Micrografías STEM en campo oscuro y claro de la muestra tratada a 373K. El contraste en la imagen del lado izquierdo, revela la ocupación de los túneles por la HA.

En la figura 5 se puede observar la HA tanto en los túneles como en agregados en torno a la sílice mesoporosa.



**Fig 5.** Micrografía TEM del material HA-SBA-15 mostrando los agregados de nanopartículas de HA entorno a una partícula de matriz de sílice.

La alta resolución en la mitad superior de la micrografía proviene de los túneles con dirección perpendicular al haz electrónico y no presenta mayores variaciones en el contraste, ni en los túneles ni en las paredes de los mesoporos debido probablemente a la uniformidad o regularidad de la muestra, v.gr. espesor uniforme.

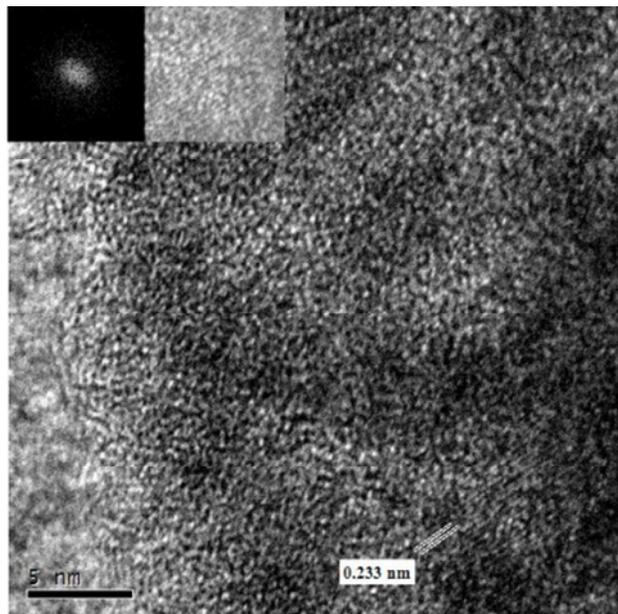


**Fig 6.** Micrografía de la muestra HA-SBA-15 tratada a 373 K mostrando mediciones de los parámetros texturales.

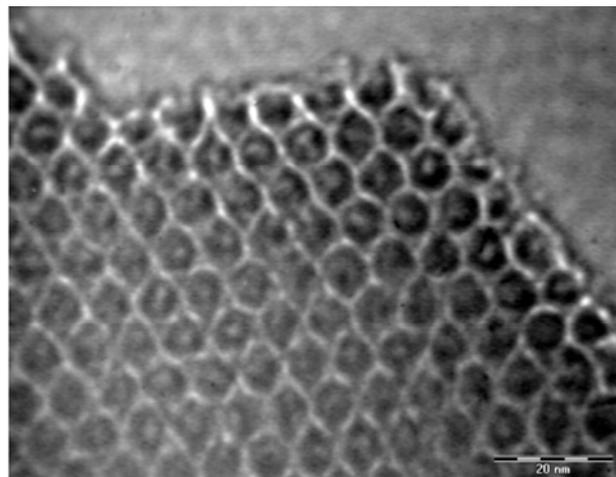
En la micrografía de la figura 6 que proviene de la muestra tratada hidrotermalmente a 373 K que se obtuvo a 400 keV y a bajas ampliaciones, se presentan dos láminas del HA-SBA 15 en contacto y en orientaciones ortogonales. Se observa con gran nitidez y claridad la configuración hexagonal de los canales mesoporosos así como las dimensiones de los poros, el ancho de las paredes y las distancias entre los canales del material. En la figura se observan detalles interesantes relacionados con la ocupación de los túneles por la HA: a) La entrada de los mesoporos con configuración hexagonal presenta variaciones en la forma de los mismos. Esto puede ser consecuencia de la expansión irregular de los mismos durante la síntesis de la HA en el interior de los mismos. b) El contraste en todos los túneles no es el mismo, esto puede ser debido a que los mismos no estén todos en la dirección del haz electrónico y a que hayan variaciones en el potencial cristalino que origina el contraste de fase que se observa en la imagen y c) Se pueden observar variaciones en el espesor de las paredes de los mesoporos y el rompimiento parcial de las mismas.

La figura 7 corresponde también al material composite HASBA-15 tratado a 373 K. Para las condiciones en que se obtuvo la micrografía, (300,000 X) y el enfoque correspondiente, detalles de resolución de red del mesoporoso (distancias interplanares, ancho de las paredes, dimensión de los poros, no son por lo general observables y la sílice SBA-15 aparece en la micrografía como amorfa, mientras que los detalles con resolución de red, mostrados en los recuadros de la parte superior izquierda de la imagen, corresponden a la fase de HA con distancias interplanares de 0.233 nm. Los recuadros mencionados, corresponden a las transformadas de Fourier directa (patrón de difracción) e inversa (Imagen con contraste mejorado para mostrar los planos cristalinos de la HA) de la zona inferior derecha de la imagen. Realizando series focales de alguna zona de interés del material composite se han podido encontrar configuraciones nanocristalinas sobre el soporte mesoporoso, aun cuando las condiciones de visibilidad

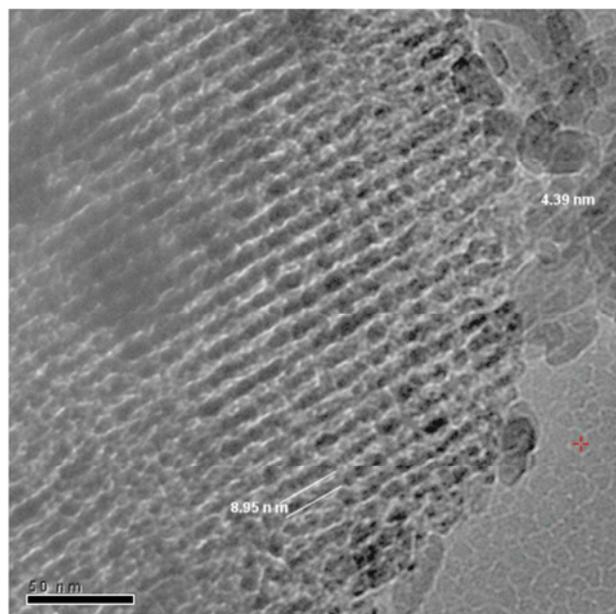
no son muy favorables debido a efectos propios del enfoque y del espesor de la muestra. Los efectos de variaciones de contraste en los canales (túneles) de la sílice mesoporosa se observan con mayor frecuencia en las muestras tratadas a 373, 383 y 393 K respectivamente. Esto se puede observar en la micrografía de la figura 8, donde son notables los cambios de contraste entre pares de mesoporos vecinos. Así mismo se puede observar en la parte inferior de la imagen, tanto la distorsión de los túneles como el rompimiento de algunas de las paredes de los mesoporos. Las imágenes de HREM para una misma condición de enfoque pueden presentar cambios de contraste debido a cambios de potencial en la muestra a lo largo de la dirección del haz de electrones. Estudios más extensos del material como tomografía electrónica o simulación de imágenes pueden arrojar más evidencias al respecto.



**Fig 7.** Micrografía HREM de la muestra sometida a tratamiento hidrotérmico a 373 K. En los recuadros, se observa las TF directa e inversa de parte inferior derecha de la imagen, que corresponde a la HA localizada en uno de los mesoporos del material.

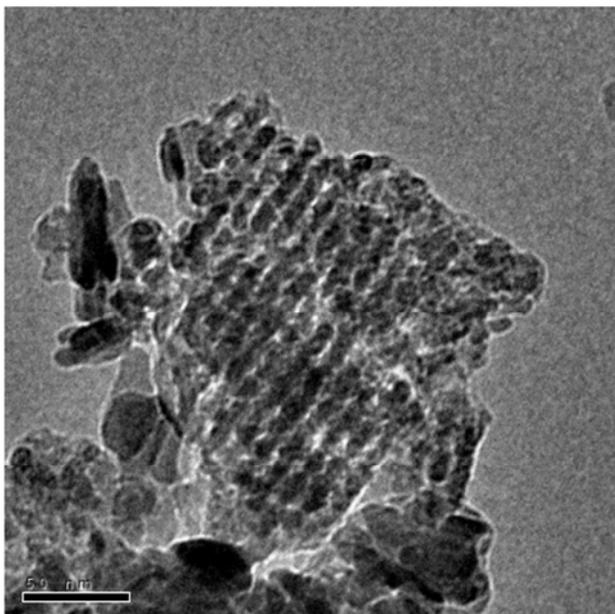


**Fig 8.** Micrografía de la muestra tratada a 393 K se pueden apreciar tanto cambios notables de contraste como en la geometría en los poros del HA-SBA-15.



**Fig 9.** Micrografía de muestra HA-SBA 15, tratada a 373 K. Se observa que la fase correspondiente a la HA no presenta una ocupación continua y regular a lo largo de la configuración de los túneles.

En las figuras 9 y 10 se presentan micrografías HREM de muestras tratadas a 373 y 393 K respectivamente. El nivel de ocupación de los túneles del mesoporo por la HA es notable siendo mayor para la muestra tratada a mayor temperatura. Esto se puede deber a que a temperaturas más altas, el grado de sinterización de la HA en los túneles es mayor que la correspondiente a temperaturas menores.



**Fig 10.** En esta imagen de la muestra tratada a 393 K, se aprecia una densidad alta de granos alargados de HA a lo largo de la configuración de los túneles.

## CONCLUSIONES

De las micrografías de HREM se puede inferir que para todos los tratamientos en el material compuesto HA-SBA15 se da una interacción entre los dos elementos del compuesto la sílice mesoporosa y amorfa y la fase cristalina de HA. Es decir que no hay evidencias de que la fase de HA y la sílice se den de forma separada e independiente a modo de mezcla física sino que la fase de HA está anclada a la matriz de la sílice. Para los tratamientos hidrotermales a las temperaturas más altas, se detecta una concentración mayor de HA en los túneles mesoporosos de la sílice. Con el primer tratamiento hidrotermal, se favorece en forma diferenciada, la nucleación de cristalitas de HA en los túneles y es muy probable que con el segundo tratamiento a 500<sup>a</sup> C durante diez horas se promueva el sinterizado de los mismos.

Dentro de los túneles del material mesoporoso se observan diferentes configuraciones de la HA sobre o en la estructura interna de los mesoporos. En las micrografías HREM se detecta la cristalinidad correspondiente a la HA en el interior de los túneles. Los

cambios que se observan en las geometrías de los poros en imágenes HREM de bajas ampliaciones están relacionados directamente con la ocupación y crecimiento de la HA en los túneles.

## AGRADECIMIENTOS.

Se agradece y reconoce el apoyo económico de la DGAPA de la Universidad Nacional Autónoma de México a uno de los autores (DRA), para realizar una visita de trabajo a la Universidad de Sevilla. También al Ministerio de Educación y Ciencia (Convenio MEC-CSIC I3); Proyecto Intramural Especial (PIE); 200660I122. Se tuvo también y se agradece, un apoyo parcial y limitado del proyecto PIFUT08-129 del ICYTDF.

## REFERENCIAS

- [1] Mattox K. (1992) “*The global biomaterials where hard tissue biomaterials fit in*”. In *Hard Tissue Repair and Replacement*, Vol. 3, Muster, D. Ed. Amsterdam: Elsevier.
- [2] Rosa A.L., Beloti V., Oliveira, V. (2002) “Osseointegration and osseointegration of hydroxyapatite of different micro- porosities”. *Journal of Materials Science – Materials in Medicine* 13:1071–1075.
- [3] Cao H., Zhang L., Zheng H., Wang Z. (2010) “Hydroxyapatite nanocrystals for biomedical applications” *Journal of Physical Chemistry C*, 114: 18352–18357.
- [4] Vallet-Regí M. (2010) “Evolution of bioceramics within the field of biomaterials” *C.R. Chimie* 13: 174-185.
- [5] Kikuchi M., Itoh S., Ichinose S., Shinomiya K. Tanaka J., (2001) “Self-organisation mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo” *Biomaterials* 22: 1705-1711.

- [6] Chang M.C., Douglas W.H., Tanaka J., (2006)  
“Organic-inorganic interaction and the growth mechanism of hydroxyapatite crystals in gelatin matrices between 37 and 80 °C” *Journal of Materials Science – Materials in Medicine* 17: 387-396.
- [7] Díaz A., López T., Manjarrez J., Basaldella E., Martínez-Blanes J.M., Odriozola J.A. (2006)  
”Growth of hydroxyapatite in a biocompatible mesoporous ordered silica” *Acta Biomaterialia* 2:173–179.