

## EFFECTO DEL NÍQUEL EN LA FORMACIÓN Y ESTABILIDAD DE FOSFATOS DE CALCIO AMORFOS

J. Guerra-López<sup>1,\*</sup>, R. González<sup>1</sup>, R. Pomés<sup>1</sup>, P. Quintana<sup>3</sup>, G. Punte<sup>2</sup>, C. O. Della Védova<sup>2b</sup>

Recibido Octubre 1/98 – Aprobado Octubre 15/99

**Keywords:** Amorphous calcium phosphate, hydroxiapatite, X-ray diffraction analyses, infrared spectroscopy crystallinity and stability.

### ABSTRACT

X-ray diffraction, infrared spectroscopy, chemical and thermal analysis have been carried out on Ca<sub>2</sub>Ni amorphous phosphate solid solutions. The data reported are in agreement with the hypothesis that nickel stabilized the amorphous phase and inhibited the mechanism of apatite formation. The inhibitory effect of nickel on hydroxiapatite formation is larger than the one exhibited by Magnesium or Barium.

### RESUMEN

Diferentes fosfatos de calcio fueron caracterizados por análisis químico, difracción de rayos X, análisis térmico y espectroscopía IR. Los resultados obteni-

dos indican que la incorporación de níquel a fases amorfas de fosfatos de calcio afecta el mecanismo de formación de sistemas apatíticos. El carácter inhibitorio del níquel es mucho mayor que el observado, por otros autores, para iones como el magnesio o el bario.

### INTRODUCCIÓN

Los fosfatos de calcio han sido ampliamente estudiados por su influencia en la formación del tejido óseo. Dentro de estos sistemas, la brushita (DCPD), los fosfatos octacálcicos (OCP), los fosfatos de calcio amorfos (ACP) y la hidroxiapatita (HAP) se destacan por su importancia en los procesos de mineralización (1-2).

En particular, la transformación de los ACP a hidroxiapatita ha sido estudiada por diferentes métodos de análisis (3-6). Se ha podido demostrar, que la cristalización de estos sistemas va a estar regulada por las condiciones de reacción (temperatura, pH) y la presencia en solución de

1. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Cuba.
2. LANADI y PROFIMO, Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, CC 67 (1900), La Plata, Argentina.
- 2b. Laboratorio de Servicio a la industria y al sistema científico, LaSeisc (UNLP-CIC-CONICET), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 47 esq. 115 (1900), La Plata, Argentina.
3. Cinvestav-Unidad Mérida, México.
4. Dirección actual: Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de Luján, ruta 5 y 7, Luján, Argentina.  
\* A quien corresponde pedir información.

agentes estabilizantes o inhibidores. En particular iones como el  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $CO_3^{2-}$  inhiben el proceso de formación de fases apatíticas, mientras que por el contrario los polifosfatos orgánicos así como el hierro y el indio la favorecen (7-9).

A pesar de los avances obtenidos en el estudio de los mecanismos de cristalización de los compuestos amorfos, poco se conoce del efecto que iones como el Ni ejercen sobre los mismos (10-11). Por estudios *in vitro* se sabe que, tanto el níquel como el cromo pueden eluir desde las prótesis dentales (12-13). Como la elusión de estos iones puede ocurrir *in vivo*, la misma podría tener influencia en los procesos de mineralización oral, lo que hace necesario un estudio más profundo del efecto que estos iones pueden tener en la precipitación de fosfatos de calcio.

El objetivo del presente trabajo es el estudio del efecto de la incorporación de Ni en la formación y estabilidad de fosfatos de calcio. Para conseguir ese objetivo se utilizaron: difracción de Rayos x, espectroscopía IR y análisis químicos. Los resultados obtenidos demuestran que la presencia creciente de níquel en solución favorece la formación de fases amorfas. Se pudo demostrar que la incorporación del Ni a estos sistemas inhibe su posterior transformación a compuestos del tipo apatítico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los fosfatos de calcio amorfos se sintetizaron por vía húmeda. Se hicieron reaccionar sobre un buffer de acetato 1M soluciones 0.2 M de  $(NH_4)_2HPO_4$  y otra, de composición variable, que contenía  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  y  $Ni(Ac)_2 \cdot 4H_2O$ . Las mues-

tras se obtuvieron variando en pasos la concentración de níquel en la solución. Se comenzó con  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  puro hasta llegar a 25% en la concentración de átomos de Ni por ciento en la solución. La reacción se realizó a 98°C y a pH 7. Durante las síntesis el pH de la solución se mantuvo constante por la adición controlada de soluciones de  $NH_3$  y de HCl 0.1 M. Las lecturas del pH se llevaron a cabo en un MV 870 Digital pH-Messegerät utilizando un electrodo combinado. El electrodo se calibró con soluciones buffer preparadas, según los requisitos del National Bureau of Standards, a 25°C (14). Los precipitados se filtraron y se secaron a 100°C. Las muestras así obtenidas fueron rotuladas por el símbolo Ni seguido del porcentaje de dicho elemento en la solución.

Los estudios de estabilidad se realizaron tanto por métodos químicos como físicos. Para estudiar la estabilidad de los compuestos sintetizados se dejaron envejecer los precipitados, hasta 96 h, en sus aguas madres. Cada 24 horas se tomaron muestras para ser analizadas por espectroscopía IR y difracción de Rayos X. En el caso de las muestras tomadas a las 48 h se les realizó, además, un tratamiento térmico a 200-700°C y se hidrolizaron a 100°C.

La composición química de cada muestra se determinó por Absorción Atómica (Ni y Ca) y por colorimetría (fósforo) (15). Los análisis estructurales se llevaron a cabo por FTIR en un equipo IFS 48 Bruker en el rango de 4000-400  $cm^{-1}$  y por difracción de rayos x en un difractor Philips PW1710 con radiación monocromática de  $CuK\alpha$  ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ). Los patrones de difracción se registraron en modo continuo con una velocidad de 2°/min en el rango 10-70° en 2 $\theta$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La síntesis de los compuestos del tipo  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  se favorecen a pH altos y bajas temperaturas (9). A pH más bajos, la incorporación de los iones  $\text{HPO}_4^{2-}$  posibilita la formación de estructuras del tipo brushita ó fosfatos octacálcicos en lugar de fosfatos amorfos. No obstante la incorporación de agentes estabilizadores como el  $\text{Mg}^{2+}$  y el  $\text{CO}_3^{2-}$  permite la síntesis de fosfatos amorfos en presencia de los iones  $\text{HPO}_4^{2-}$  (4).

Las investigaciones realizadas por LeGeros y colab. (3) muestran que la presencia de Mg (Mg/Ca (30/70)) y Ba (Ba/Ca de igual relación atómica) dan como resultado la formación de compuestos amorfos. Sin embargo, si la síntesis se realiza a mayores temperaturas, para que precipiten compuestos amorfos es necesario disminuir la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en solución. Los trabajos realizados recientemente por Abbona y Baronnet han confirmado el efecto estabilizador del magnesio en la formación de fosfatos de calcio amorfos (16).

En nuestros estudios hemos observado que a diferencia de los trabajos mencionados, la presencia del níquel en solución favorece la precipitación de fosfatos de calcio amorfos, a pH neutros y temperaturas cercanas a los  $100^\circ\text{C}$ , sin que se afecte la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en solución. Como se muestra en la tabla 1, el proceso de cristalización a estructuras apatíticas va a estar relacionado con la concentración de níquel en el sólido.

En una primera etapa, la fase sólida, separada una vez concluida la reacción de precipitación (tiempo cero), se caracteriza

por la ausencia de máximos en su patrón de difracción y la baja resolución en las bandas de estiramiento y desdoblamiento de los grupos  $\text{PO}_4^{3-}$ . Durante el proceso de envejecimiento, se observa que: en el caso de los compuestos sintetizados en presencia de bajas concentraciones de níquel (relación Ni/Ca=0.03-0.05) la aparición de máximos de difracción a las 24 h, los cuales se van haciendo más definidos con el transcurso del tiempo. En el caso de los ACP sintetizados en presencia de mayores concentraciones de níquel, el proceso de cristalización es mucho más lento.

El resultado de los análisis químicos demuestra que en todos los casos, todo el Níquel se incorporó a la fase sólida. Si bien la ausencia de señales en el patrón de difracción impide en algunos casos determinar la presencia de una nueva fase, el análisis de los espectros IR no evidencia que estén presentes otras bandas de absorción que no sean las correspondientes al fosfato. En los espectros se destaca la presencia de una banda, en la zona de  $890$  a  $870\text{ cm}^{-1}$ , característica del ion  $\text{HPO}_4^{2-}$  (fig.2). Como se conoce de la literatura, este ion no se incorpora a la estructura de los fosfatos de calcio amorfos (1-3). La presencia de los iones  $\text{HPO}_4^{2-}$  puede tener dos explicaciones diferentes: una la formación de dos fases (una apatítica y otra amorfa) y la segunda la presencia de defectos estructurales provocados por la sustitución de Calcio por Níquel.

Los resultados obtenidos al tratar térmicamente las muestras envejecidas durante 48 h (tabla 2), permiten proponer la formación de una nueva fase. El tratamiento a  $600^\circ\text{C}$  de los fosfatos amorfos da como resultado la formación de dos fosfatos de calcio diferentes. La concentración

mayoritaria corresponde al fosfato tricálcico parcialmente sustituido por níquel (TCNP) y la minoritaria al pirofosfato. En ninguno de los casos de los fosfatos tratados ( $Ni_{10}$ ,  $Ni_{15}$  y  $Ni_{20}$ ) se observó la presencia de bandas características de una hidroxiapatita, por el contrario los compuestos apatíticos ( $Ni_3$ ,  $Ni_5$ ) permanecen estables a esta temperatura, resultado esperado ya que como se conoce aún en el caso de hidroxiapatitas no estequiométricas, la transformación a TCP se produce a temperaturas más elevadas (1-2, 18-20).

Lo anteriormente expuesto nos permite concluir que en el caso de los fosfatos amorfos no coexisten el fosfato amorfo y la HAP y que la estructura más probable para estos compuestos es del tipo  $Ca_{(3-x)}Ni_x(PO_4)_{2-y}HPO_{4y}.nH_2O$  ( $n=2-3.5$ , 10-18 % en peso). La presencia del  $HPO_4^{2-}$  en la estructura, se debe por tanto a las variaciones que se producen con la incorporación del Níquel.

Los cambios estructurales que tienen lugar durante la formación de ACP en presencia de Níquel, pueden ser explicados tomando como modelo el desarrollado por Posner y Betts (20). En este modelo se supone que se forma una fase del tipo de la witlokita ( $Ca_{(3-x)}Ni_x(PO_4)_2$ ) con espacios intersticiales ocupados por moléculas de agua (esto se debe a que la razón  $Ca^{2+}/PO_4^{2-}$  en los fosfatos es menor, 1,5, que en la HAP, 1,67). En el presente caso es de esperar que la razón ( $Ca^{2+}, Ni^{2+}$ )/ $PO_4^{2-}$  sea igual o menor que en los fosfatos de Ca sin sustituir. La sustitución del  $Ca^{2+}$  por  $Ni^{2+}$  disminuye las distancias de enlace M-M y M-O en la molécula, debido a que el radio iónico del  $Ni^{2+}$  es 0.69 y el del Ca es 0.99. Este hecho favorece la creación de espacios in-

tersticiales que posibilitan la incorporación no sólo de agua, como en el caso de los fosfatos de Calcio, sino también de otros iones, como el  $HPO_4^{2-}$ , presentes en la solución.

El análisis de los espectros de FTIR, ver la Figura 1, muestra que la intensidad de la banda en  $879\text{ cm}^{-1}$  no varía con el aumento de la concentración de níquel en solución. Este hecho sugiere que no todo el níquel que se incorpora a la estructura ocupa las posiciones del calcio. De ser así, en la misma medida que aumenta la concentración de níquel en el sólido debería aumentar la incorporación del  $HPO_4^{2-}$  o del agua. Otro aspecto a tener en cuenta es la estabilidad térmica; una estructura de este tipo sería más inestable que el compuesto sin sustituir, lo que no se corresponde con los resultados obtenidos (tabla 2).

Todo lo anterior nos permite suponer que no todo el níquel incorporado en el sólido va a ocupar las posiciones del calcio, sino que una parte va a ocupar los espacios creados por la disminución de las distancias de enlace intramoleculares. De esta forma aumenta la estabilidad de los compuestos en solución y se regula la incorporación de otros iones o moléculas.

### Influencia del níquel en el mecanismo de transformación de ACP a HAP

La transformación de un fosfato de calcio a otro, tanto en los sistemas *in vivo* como *in vitro*, puede producirse por hidrólisis o por disolución y recristalización a una fase más estable bajo condiciones fluctuantes de pH y temperaturas (1-2, 18). En lo concerniente al proceso

de cristalización de ACP a HAP, en la literatura se plantean dos posibles mecanismos de reacción. En particular la presencia de otros iones o moléculas en solución puede inhibir o acelerar la reacción. Iones como el  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $CO_3^{2-}$  inhiben el proceso de formación de fases apatíticas, mientras que por el contrario los polifosfatos orgánicos así como el hierro, el flúor y el indio la favorecen. Nuestros resultados demuestran que la presencia del níquel en solución, inhibe los procesos de formación de estructuras del tipo apatítico.

La incorporación del níquel a la estructura de los fosfatos de calcio amorfo va a ejercer un fuerte efecto sobre su morfología y cristalinidad, que repercute en los procesos de nucleación de HAP. Como se muestra en la Figura 3, la presencia de pequeñas concentraciones de  $Ni^{2+}$  afecta el índice de cristalinidad del material. Esto se traduce en la disminución de las intensidades y el ensachamiento de las líneas de difracción (ver reflexiones 211, 112, 300 y 202 en la figura 3) en comparación con los de una hidroxiapatita sin substituir. Esto se debe a la diferencia que existe entre los radios iónicos del calcio y el níquel (0.99 Å por 0.69 el Ni), que produce una disminución del enlace metal oxígeno en la molécula (Ni-O es 2.08 Å mientras que el enlace Ca-O en la HAP está en el rango de 2.443-2.555 Å).

Debido a los constreñimientos estructurales que produce el níquel en las estructuras apatíticas, el nucleamiento de la HAP comenzará con la salida de los iones  $Ni^{2+}$  de la estructura. Al final sólo estará presente una cantidad de iones tal como para que no se afecte la estabilidad estructural, el resto estará en solución. Como se observa en la figura 4, la transformación

de ACP a HAP va a estar acompañada por una disminución en el radio atómico Ni/Ca. La reacción ocurre en dos etapas la primera más rápida, en la que pasan a la solución los iones de Níquel que no se encuentran ocupando directamente las posiciones del calcio y una segunda etapa más lenta donde se tienen que romper los enlaces M-M.

Estos resultados demuestran que el mecanismo de transformación de un compuesto amorfo a uno apatítico, es un proceso de disolución/precipitación similar al descrito para la formación del enlace entre los biomateriales de fosfato de calcio y el hueso (21). El paso lento de este mecanismo es el proceso de disolución y liberación del Ni al medio.

En nuestros compuestos, no se detectó en ningún momento la formación de otra fase que no fuera la apatítica (DCPD u OCP). La no presencia de estos compuestos como intermediarios del proceso de formación de HAP se debe tanto a la temperatura como al pH al cual fueron realizados los experimentos. Esto confirma la importancia de las condiciones de reacción en los procesos de formación de estructuras apatíticas.

## CONCLUSIONES

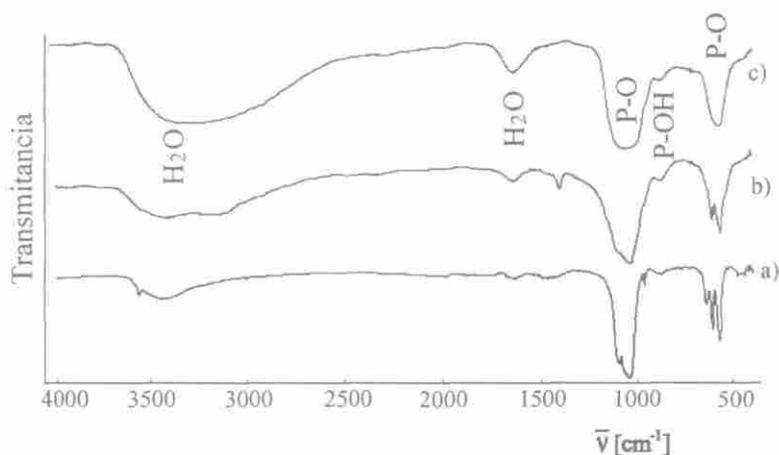
Se estudió el efecto que ejerce el níquel sobre la síntesis de compuestos amorfos y su estabilidad en solución. El carácter inhibitorio del níquel sobre la formación de estructuras apatíticas, es mucho mayor que el encontrado, por otros autores, para iones como el magnesio o el bario. La presencia en solución de pequeñas concentraciones de Ni hace que aún a temperaturas cercanas a los 100°C, se

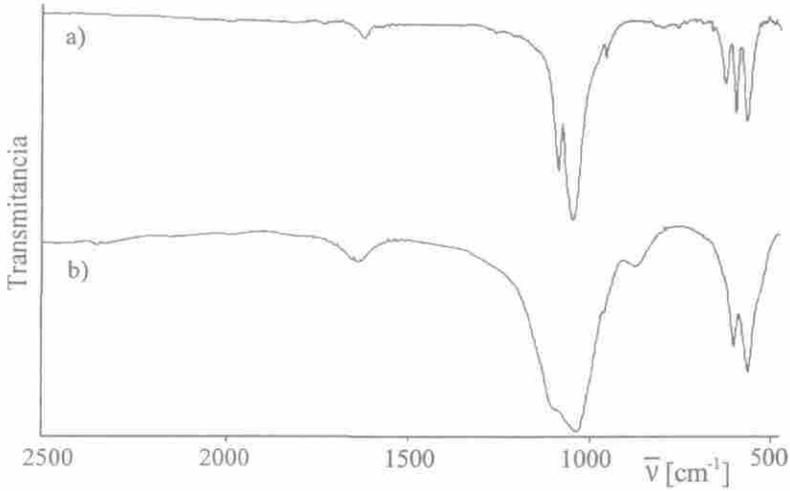
**Tabla 1.** Estabilidad de fosfosamorfos en solución.

Ni %	Compuesto (0h)	Aguas madres (48h)	Aguas madres (96h)	Hidrólisis a 100°C
Ni 3	Amorfo	(Ca,Ni)HAP	(Ca,Ni)HAP	(Ca,Ni)HAP
Ni 5	Amorfo	(Ca,Ni)HAP	(Ca,Ni)HAP	(Ca,Ni)HAP
Ni 10	Amorfo	Amorfo	(Ca,Ni)HAP	(Ca,Ni)HAP
Ni 15	Amorfo	Amorfo	(Ca,Ni)HAP	(Ca,Ni)HAP
Ni 20	Amorfo	Amorfo	Amorfo	Amorfo

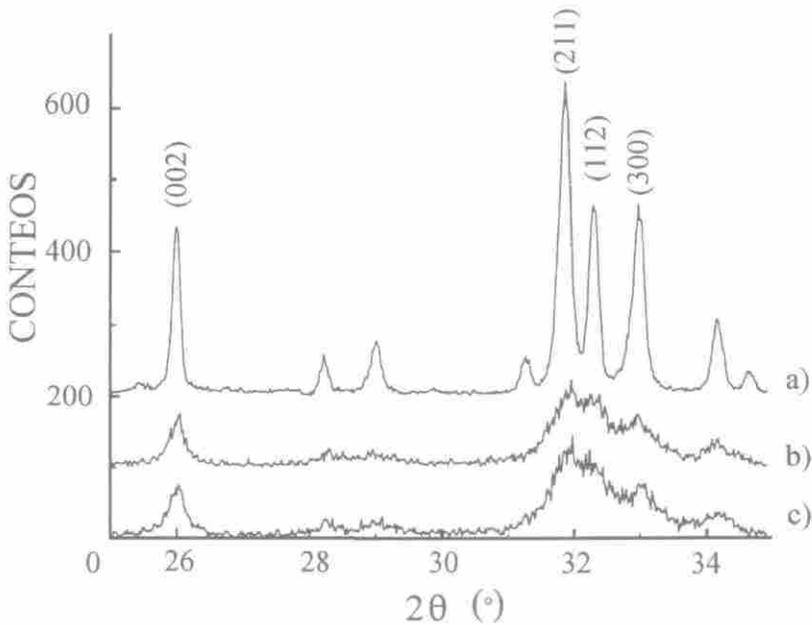
**Tabla 2.** Estabilidad térmica de los fosfos sintetizados.

Ni %	200°C	500°C	600°C
Ni 3%	(Ca,Ni)HAP	(Ca,Ni)HAP	(Ca,Ni)HAP
Ni 5%	(Ca,Ni)HAP	(Ca,Ni)HAP	(Ca,Ni)HAP
Ni 10%	Amorfo	TCNP+Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	TCNP+Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
Ni 15%	Amorfo	Amorfo	TCNP+Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
Ni 20%	Amorfo	Amorfo	TCNP+Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>

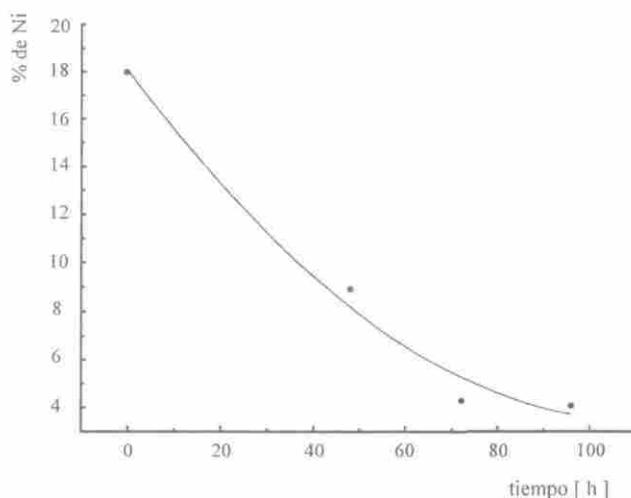

**Figura 1.** Espectros IR de los fosfos de calcio sintetizados en presencia de diferentes concentraciones de níquel a las 48 h. a) 0, b) 5, c) 10.



**Figura 2.** Espectro IR de Hidroxiapatitas de calcio: a) libre de níquel. b) Hidroxiapatitas sustituidas con níquel.



**Figura 3.** Patrón de difracción de la Hidroxiapatita: a) sin sustituir. b) 3 % de níquel en solución. c) 5 % de níquel en solución.



**Figura 4.** Variación de la concentración de níquel en el tiempo.

formen compuestos amorfos. Durante el proceso de envejecimiento de los precipitados, la cristalinidad está acompañada por una disminución de la concentración de níquel en el sólido. La incorporación del níquel, estabiliza la estructura de los ACP por lo que afecta negativamente el mecanismo de formación de los compuestos apatíticos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. LeGeros, R. Z., *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*, Karger, Basle, 1991, Capítulo 3, pp. 110-136.
2. Elliott, J. C., *Structure and Chemistry of the Apatite and Other Calcium Orthophosphates*. Elsevier, Amsterdam, 1994. Capítulo 2, pp.70-115.
3. LeGeros, R. Z.; Shirra, W. P.; Miravite, M. A. y LeGeros, J. P. (1975), *Amorphous calcium phosphates: Synthetic and biological. Colloques Internationaux C.N.R.S.*, **230**, 105-115.
4. Holt, C.; Van Kemenade, M. J. J. M.; Harries, V L.; Nelson, S; Bailey, V D.; Hukins, W. L.; Hasnain, S. S. y De Bruyn, P. L. (1988), Preparation of amorphous calcium/magnesium phosphates at pH 7 and characterization by x-ray absorption and fourier transform infrared spectroscopy. *J. Crystal Growth*, **92**, 239-252.
5. Christoffersen, J; Christoffersen, M. R.; Kibalcyc, y Andersen, A. (1989), The effect of magnesium ions on the precipitation of calcium phosphates *J. Crystal Growth* , **94**, 767.
6. Lazic, S. (1995), *J. Crystal Growth*. **147**, 145.

7. Blumenthal, N. C.; Betts, F. y Posner, A. S. (1975), *Mater. Res. Bull.* **10**, 1055-1060.
8. Hidaka, S.; Okamoto, Y.; Abe, K., y Miyazaki, K. (1994), *J. Biomed. Mat. Res.* **28**, 1403.
9. Hidaka, S. y Okamoto, Y. (1994), *J. Biomed. Mat. Res.* **28**, 1403.
10. LeGeros, R. Z., *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*, Karger, Basle, 1991. Capítulo 4.
11. Root, M. J. (1990), *Calcif. Tissue Int.* **47**, 112.
12. Newman, V; Chamberlain, R. T. y Nuñez, L. J. (1981), *J. Biomed. Mater. Res.*, **15**, 615.
13. Hidaka, S.; Okamoto, Y., y Abe, K. (1994), *J. Biomed. Mater. Res.* **15**, 175.
14. Bates, R. G. (1962), *J. Res. Natl. Bur. Std. (US)*, **66A**, 179.
15. Portal, J. (1994), *Tesis de Lic. Universidad de la Habana*, La Habana.
16. Abbona, K. y Baronnet, A. (1996), *J. Crystal Growth*, **165**, 98.
17. Kanazawa, T, Ed. *Inorganic Phosphate Materials*. 1989, Elsevier.
18. Bigi, A.; Falini, G.; Foresti, E.; Gazzano, M.; Ripamonti, A. y Roveri, N. (1993), *J. Inorganic Biochem.*, **49**, 69.
19. Yasukawa, A.; Ouchi, S.; Kandori, K., y Ishikawa, T. (1996), *J. Mater. Chem.* **6**, 1401.
20. Posner, A. S. y Betts, F. (1975), *Bone Mineral Structure*, **8**, 273.
21. LeGeros, R. Z., y LeGeros, J. P. *An Introduction to Bioceramics*, 1993, Eds. L. L. Hench and Wilson, World Science, Singapore, p 139.