

Métodos de disolución en muestras de hidroxiapatita y corales

Ana Cecilia Rodríguez, Maria Cristina Melo, Luis Figueroa* y José Alvarado.*

Departamento de Química Analítica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6990, Ciudad de La Habana, Cuba. *Departamento de Química, Universidad Simón Bolívar, Apartado Postal 89000, Caracas, Venezuela.

Recibido: 5 de diciembre de 1998. Aceptado: 24 de junio de 1999.

Palabras clave: hidroxiapatita, corales, métodos de disolución, espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica, corrección de fondo Zeeman.

Key words: hydroxiapatite, corals, methods of dissolution, atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization, Zeeman background correction.

RESUMEN. La utilización de muestras de hidroxiapatita y corales en implantes óseos, requiere conocer con exactitud el contenido de algunos metales en dichas muestras. Elevados contenidos de metales como Cu y Pb pueden excluir el uso de dichas muestras con el propósito mencionado. En el presente trabajo se estudiaron tres métodos de preparación de muestras (digestión ácida convencional, uso de microondas en envases cerrados y preparación de suspensiones) para la determinación del contenido de Cu y Pb en muestras de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ y de corales por Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización Electrotrémica (EAA-AE) y corrección de fondo mediante efecto Zeeman. Se comprobaron las ventajas del proceso de disolución con microondas y la preparación de suspensiones con relación a la digestión convencional en lo referente al ahorro de reactivos y tiempo y la menor posibilidad de contaminación. Para las determinaciones de los metales mencionados, se optimizaron los parámetros de operación del espectrómetro, así como los programas de calentamiento del horno para cada elemento. Se utilizó una muestra de referencia internacional (IAEA-H-5 Animal Bone) para estimar la exactitud de las determinaciones de Pb. En el caso de las determinaciones de Cu, se realizaron ensayos de recuperación obteniéndose valores entre 95 y 105 %. Se calcularon los límites de detección según el criterio de la IUPAC, obteniéndose los valores siguientes: 0,15 y 1,05 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ para Cu y Pb respectivamente. El contenido de estos metales encontrado en las diferentes muestras es suficientemente bajo como para permitir su utilización en implantes óseos.

ABSTRACT. The utilization of samples of hydroxiapatite and corals in implant bone requires to know the content of some metals with accuracy. High contents of Cu and Pb could exclude the use of these samples with this purpose. This paper was studied three methods of preparation of samples (conventional digestion, use of microwave in closed containers and preparation of suspensions) for the determination of the Cu and Pb in samples of hydroxiapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ and corals for Atomic Absorption Spectrometry with Electrothermal Atomization, AAS-EA and correction by Zeeman effect. The advantages of the process of dissolution with microwave and the preparation of suspensions in relationship to the conventional digestion were checked with respect to saving of reagents and time and the least possibility of contamination. For the determinations of metals, the parameters of operation of the spectrometer were optimized, as well as the heating program of the oven for each element. An international reference material was utilized (IAEA-H-5 Bone Animal) in order to check the accuracy of the determinations of Pb. In case of the determinations of Cu tests of recuperation were carried out getting security values between 95-105 %. The detection limits were calculated according to the IUPAC criterion and the results were: 0,15 and 1,05 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ for Cu and Pb respectively. The levels of these metals found in the samples are low and permit the utilization of the same in implant bones.

INTRODUCCION

En la plataforma insular cubana existen diversas familias de corales, los cuales actúan como sensores de la contaminación en esas zonas.^{1,3} Algunas de estas especies han encontrado aplicación en la obtención de hidroxiapatitas, las cuales, por su estructura y propiedades extraordinariamente parecidas al hueso humano han permitido la sustitución del injerto metálico en cirugía ortopédica, maxilofacial y otras.⁴ El éxito de estas intervenciones se ha debido a la perfecta osteointegración con el verdadero tejido óseo, lo cual se observa a pocos meses de realizada la implantación del injerto de hidroxiapatita.⁵

El control de metales pesados tanto al material de partida (coral), como a la hidroxiapatita es una tarea obligada para descartar la posibilidad de consecuencias negativas que pudieran ser causadas por la presencia de algunos de aquellos debido a que los microelementos presentes en estos materiales desempeñan un papel muy importante en los mecanismos bioquímicos y enzimáticos que favorecen los procesos de mineralización.⁶

La utilización de la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización Electrotrémica (EAA-AE) permite determinar la cantidad en que se encuentran dichos metales en esos materiales.⁷ Esto, unido a la corrección de fondo

por efecto Zeeman permite lograr resultados más exactos aún para muestras de matriz compleja que presenten fondo estructurado.⁸ Aunque disponiendo de estas ventajas con relación al instrumento, la espectrometría de absorción atómica requiere, generalmente, la presencia de la muestra en forma de disolución.

La búsqueda de métodos adecuados de disolución es un paso necesario en el trabajo analítico. Las técnicas de digestión convencional consumen tiempo y reactivos.⁹ Con la utilización de la energía de microondas, esta dificultad se minimiza.¹⁰ Sin embargo, es necesario disponer del equipo correspondiente el cual es costoso, por lo que generalmente no está al alcance de todo laboratorio. La preparación de suspensiones resulta entonces una alternativa viable, interesante y además económica, si se logra que sean o puedan hacerse homogéneas de modo que permitan la introducción de una cantidad reproducible de la muestra suspendida cada vez que se realice una inyección de la suspensión en el atomizador.¹¹

El objetivo de la presente investigación fue encontrar el método más idóneo y económico para la preparación de muestras de hidroxiapatita y corales para la posterior determinación de su contenido de Cu y Pb por EAA-AE y corrección de fondo Zeeman.

PARTE EXPERIMENTAL

Equipos

La pesada de las muestras se realizó en una balanza analítica Mettler modelo AJ 180 con precisión de ± 0,01 mg.

En la digestión convencional se utilizó una plancha de calentamiento con agitación (Precision Scientific GCA).

Para la preparación de las muestras en forma de suspensiones se empleó un tamizador-agitador modelo RX-24 y un baño ultrasónico marca Cole-Parmer.

Las digestiones por microondas se realizaron en un horno Modelo MDS - 2000 (Corporación CEM, EU), provisto de una potencia de microondas de 0 a 630 W ± 50 W, un sistema de ventilación de gases, computadora digital programable con 20 programas multietapas y cuatro puertos de salida para el control de la temperatura y la presión.

En la preparación de muestras y patrones se utilizó agua desionizada (conductividad eléctrica 18 MΩ · cm⁻¹

obtenida a partir de un sistema de purificación de agua Nanopure (Barnstead, EU).

Espectrometría de absorción atómica

Todas las mediciones se realizaron en el espectrómetro Perkin-Elmer Modelo ZL 5100 equipado con horno de grafito y automuestreador AS-71. Se utilizaron tubos de grafito totalmente pirolíticos con plataforma de Lvov incorporada.

Reactivos

Material de referencia

Para evaluar la exactitud del método, se utilizó el material de referencia internacional IAEA-H-5 Animal Bone.

Disoluciones de trabajo para la calibración

Las disoluciones para calibración fueron preparadas por dilución convencional de disoluciones de 1 000 mg · mL⁻¹ del analito en cuestión en forma de nitrato a partir de disoluciones de referencia certificadas (Fisher Scientific).

El ácido nítrico empleado en la disolución convencional de las muestras fue de grado pa (Riedel de Haën).

Procedimiento analítico

Se analizaron tres muestras de corales de la familia porites-porites (coral, osteocoral y coral asteroides) y tres muestras de hidroxiapatita (HAP200G, HAP200 piezas y HACROM), obtenidas por transformación hidrotermal de los corales men-

cionados.⁵ Las muestras HAP200 son hidroxiapatitas porosas ceramizadas con tamaño medio de los poros de 200 μm y composición molar Ca/P de 1,66. La HAP200G son granulosos de diferentes tamaños de partícula entre 0,2 y 2 mm. La HAP200 piezas son bloques de (1 x 0,5 x 2) cm.

Para reducir el tamaño de partícula hasta 75 μm, las muestras fueron trituradas manualmente en un mortero de ágata y secadas a 105° C por 2 h. Para la digestión convencional se añadió a las muestras diferentes porciones de ácido nítrico concentrado y se colocaron en la plancha de calentamiento con agitación. Se seleccionó este ácido, ya que con él se evitan posibles pérdidas por volatilización del analito tanto en la etapa de digestión como en la determinación final por horno de grafito, además, en su caso no se presentan interferencias como ocurre con el ácido clorhídrico.¹³ Se emplearon diferentes cantidades de muestra y ácido (Tabla 1).

El calentamiento se llevó a cabo durante 8 h, se enfrió a temperatura ambiente y se transfirieron las disoluciones resultantes a frascos volumétricos de 25 mL, enrasándose con agua desionizada.

En el caso de la digestión por microondas se utilizó el CEM-MDS 2000. Se optimizó la cantidad de muestra y ácido nítrico a usar (Tabla 2).

La cantidad de muestra pesada se transfirió a los envases cerrados de

Tabla 1. Digestión convencional con ácido.

Muestra	Volumen de ácido (mL)	Cantidad de muestra (g)	Disolución
HACrom	10	1	Total
HAP200G	20	1	Total
HAP200 piezas	25	1	Parcial
Coral	10	1	Total
Osteocoral	10	1	Total
Coral asteroides	10	1	Parcial

Tabla 2. Digestión por microondas.

Muestra	Volumen de ácido (mL)	Cantidad de muestra (g)	Disolución
HACrom	0,6	0,5	Total
HA200G	0,6	0,5	Total
HAP200 piezas	0,6	0,5	Total
Coral	1	1	Total
Osteocoral	1	1	Total
Coral asteroides	1	1	Total

teflón y se añadieron diferentes porciones de ácido nítrico, luego, se sellaron y se colocaron en el horno de microondas. Las muestras fueron irradiadas según las condiciones descritas (Tabla 3). Después que los recipientes alcanzaron la temperatura ambiente, se transfirieron las disoluciones resultantes a frascos volumétricos de 25 mL y se diluyó a volumen con agua desionizada.

Para la preparación de las suspensiones se realizó una separación granulométrica en el tamizador-agitador y se escogió la fracción menor de 200 µm, de la cual se separaron tres fracciones con pesos de 0,1, 0,05 y 0,025 g. Esta última resultó la más fina, por lo que fue escogida para el trabajo posterior. Se probó su estabilidad en Viscalex HV 30 y Tritón X-100. Estos dos tensoactivos se diferencian en viscosidad, color, peso molecular y solubilidad en agua, siendo el Tritón X-100 más viscoso y menos soluble. Se emplearon 2 mL en cada caso y se enrasó a 25 mL con agua desionizada. Las suspensiones así preparadas, se colocaron en un baño ultrasónico marca Cole-Parmer alrededor de 10 min y se mantuvieron en agitación hasta la inyección en el horno. De esta manera, se logra una mejor estabilidad sin necesidad de emplear ácidos diluidos o cualquier otro reactivo junto con el tensoactivo. Se midieron los tiempos de sedimentación (Tabla 4).

El material de vidrio utilizado fue lavado de forma convencional con agua y detergente. Posteriormente, se colocó en una disolución de ácido nítrico 5% y se dejó allí por 48 h, luego se enjuagó con agua destilada y con agua desionizada de 18 MΩ, obtenida en el sistema NaNopure ultrapure water system (Barnstead, EU).

RESULTADOS Y DISCUSION

Procedimientos de disolución

En el caso de la digestión convencional se utilizaron volúmenes de ácido nítrico entre 10 y 25 mL y tiempo de 8 h. Aún así, sólo se logró disolución total en cuatro de las muestras (HAcrom, HA200 G, coral y osteocoral). En el resto de ellas (HAP200 piezas y coral asteroides), permaneció un residuo sin digerir. El peso de las muestras fue en todos los casos de 1 g. Se empleó solo ácido nítrico en el caso de las muestras que se disolvieron parcialmente debido a que en el caso de ácidos como el sulfúrico y el clorhídrico, se pre-

sentan interferencias en el horno para los elementos estudiados, que pueden producir errores en la determinación final.

En cuanto a la digestión por microondas, se optimizó la cantidad de ácido y de muestra a utilizar, encontrándose que para la hidroxiapatita son suficientes 0,6 mL de ácido nítrico para digerir 0,5 g de ella y obtener una absorbancia, sin necesidad de hacer diluciones. Para el caso de los corales se necesita 1 mL de ácido para digerir igual cantidad de muestra. Se investigaron diferentes condiciones de calentamiento, tiempo y potencia del horno de microondas para alcanzar el procedimiento de disolución más rápido y eficiente. Se obtuvo un programa óptimo de funcionamiento del horno (Tabla 3), con una sola etapa de calentamiento, una potencia de 482 758 a 344 827Pa de presión y durante un tiempo de 15 min.

En cuanto a las suspensiones resultó que con Viscalex HV30 la sedimentación es inmediata. Se consiguieron los mejores resultados con el Tritón X-100, en las muestras de HAcrom, HAP200 G y osteocoral. Para las muestras de HAP200 piezas, coral y coral asteroides, la sedimentación fue inmediata (Tabla 4). En todos los casos, las muestras fueron enrasadas en 25 mL. Estas diferencias en estabilidad entre las disoluciones preparadas con Viscalex y triton se deben a las diferentes pro-

piedades físicas y químicas de ambos reactivos.

Evaluación del procedimiento analítico

Se optimizaron los parámetros operacionales del horno de grafito para cada elemento. También, fueron optimizadas las temperaturas de secado e incineración con el objetivo de evitar salpicaduras y formación de humos durante la etapa de pirólisis (Tabla 5). Para las determinaciones de Cu y Pb fue necesario diluir las muestras a la mitad previo a la inyección de la muestra. En el primer caso se empleó como modificador el nitrato de magnesio hexahidratado (Aldrich Chem Co). Para el Pb se usó el hidrogenofosfato de amonio de la misma firma y nitrato de magnesio. El empleo de modificadores mejora las condiciones de atomización y produce resultados más reproducibles en todos los casos.⁸ Se utilizó gas argón de pureza 99,999% (AGA Venezolana C.A.) El flujo de gas fue interrumpido en la etapa de atomización.

El límite de detección se calculó según el criterio de la IUPAC (Tabla 6). Se utilizó un volumen de inyección de 20 µL y el número de réplicas por muestra fue de tres.

Exactitud de los resultados

Para chequear la exactitud del método, se disolvió el material de referencia internacional IAEA-H-5 Animal Bone en ácido nítrico 65%. En el caso del plomo, el material de referencia da un valor certificado de contenido de plomo, no así para el cobre, para el cual fue necesario realizar estudios de recobrado. Una cantidad conocida del analito en disolución ácida acuosa fue adicionada a la muestra previo a su tratamiento por los tres métodos de disolución en estudio. El contenido de cobre fue analizado después de la adición y

Tabla 3. Programa de calentamiento del horno microondas.

Etapas	1
Potencia	70
Presión (Pa)	344 827
Tiempo (min)	15:00
Ventilación (r/min)	100

Tabla 4. Tiempo de sedimentación de las suspensiones.

Muestra	Tiempo (min,s)	
	Viscalex HV30	Tritón X - 100
HAcrom	I	1,35
HA200 G	I	2,30
HA200 piezas	I	I
Coral	I	I
Osteocoral	I	0,40
Coral asteroides	I	I

I Inmediato.

Tabla 5. Condiciones de operación del horno de grafito.

Parámetro	Elemento	
	Cu	Pb
Longitud de onda (nm)	324,8	283,3
Paso de banda espectral (nm)	0,7	0,5
Corriente de la lámpara (mA)	10	10
Flujo de argón (mL · min ⁻¹)	250	250
Volumen de inyección (μL)	20	10
Programas del horno		
Secado:		
Temperatura (°C)	90,120	90,120
Tiempo (s)	20,20	5,15
Incineración:		
Temperatura (°C)	1 000	550
Tiempo (s)	20	20
Atomización:		
Temperatura (°C)	2 300	2 000
Tiempo (s)	5	5

Tabla 6. Límites de detección, coeficiente de variación e intervalo lineal de trabajo para Cu y Pb en disoluciones acuosas.

Elemento	Límite de detección (ng · mL ⁻¹)	CV (%)	Intervalo lineal de trabajo (ng · mL ⁻¹)
Cu	0,15	3,7	10 a 40
Pb	1,05	5,8	10 a 50

Tabla 7. Recuperación en el análisis de Cu en una muestra de hidroxiapatita y una muestra de coral.

Material	Concentración añadida (ng · mL ⁻¹)	Método empleado		
		Convencional	Microondas	Suspensión
		R (%)		
Hidroxiapatita	20	104,6 ± 1,7	103,6 ± 1,7	104,6 ± 1,7
	30	96,9 ± 1,3	98,8 ± 1,3	95,9 ± 1,3
Coral	20	99,8 ± 7,1	102,5 ± 7,1	99,7 ± 7,1
	30	102,7 ± 0,8	103,9 ± 0,8	96,7 ± 0,8

Tabla 8. Valores encontrados para Pb en comparación con el valor certificado.

Método convencional	Microondas	Suspensión	IAEA-H-5 Animal Bone (Valor certificado)
(μg · g ⁻¹ ± intervalo de confianza)			
2,65 ± 0,46	2,75 ± 0,22	2,4 ± 0,19	3,1 ± 0,7

comparado con los valores de las adiciones esperados, calculándose luego el recobrado (Tabla 7). En cuanto a la determinación de los contenidos de Pb, se compararon los valores encontrados con aquellos

que aparecen reportados en el certificado del material de referencia (Tabla 8).

Los valores hallados en el estudio de recobrado (95 -105 %) para Cu, así como la comparación de los encon-

trados para plomo con el reportado en el certificado, confirman la exactitud de la determinación de estos elementos en cualquiera de los tres métodos estudiados.

Los valores encontrados en las muestras de hidroxiapatita y corales usando digestión convencional, digestión por microondas y preparación de suspensiones resultaron inferiores a los límites permitidos comparado con la composición del hueso, según se conoce¹² (Tabla 9). Los tres métodos evaluados dan resultados que no difieren significativamente para un 95 % de confianza. Esto significa que en principio cualquiera de ellos es válido para determinar los contenidos de los analitos de interés en esas muestras, por lo que la selección dependerá entonces de las características del material, del analito en cuestión y de las disponibilidades del laboratorio.¹³

CONCLUSIONES

La utilización de la energía de microondas para la preparación de las muestras de hidroxiapatita y corales resulta la más eficiente y económica, requiriendo sólo pequeños volúmenes de ácido y 15 min para la total disolución, además de disminuir los riesgos de contaminación que se presentan cuando se trabaja en envases abiertos y durante largos períodos de tiempo, lo cual es un aspecto importante a considerar cuando se investigan metales pesados en pequeñas concentraciones.

La preparación de suspensiones en los casos posibles es una alternativa a tener en cuenta debido a que resulta aún más rápida y económica que la disolución por microondas.

Los contenidos de Cu y Pb encontrados en las muestras de coral e hidroxiapatita son lo suficientemente bajos como para permitir su utilización en implantes óseos en diferentes regiones del organismo humano.

BIBLIOGRAFIA

- Pastorok R.A. and Bilyard G.R. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, 21, 175, 1985.
- Muller J. Etude des Ecosystemes Littoraux de Maurice, Rapport No. 5, Synthese, Parties I á III, p. 255, Partie IV, 257-294., Annexes: Ann. I-II; Univ. d' Aix-Marseille I et II, Univ. d' Maurice, 1991.
- Gendre F. Physico-Chimie des Sulfures et Lagonaires de l'Île Maurice, de mars 1989 á mars 1991. **Geochimie, Minéralogie et Dosage**

Tabla 9. Resultados de la determinación de Cu y Pb en muestras de hidroxiapatita y corales.

Muestra	Convencional	Microondas	Suspensión en Tritón X-100
	$(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \pm \text{intervalo de confianza})$		
HAcrom	Cu $12,32 \pm 0,38$	Cu $10,88 \pm 0,36$	Cu $11,02 \pm 0,40$
	Pb $3,04 \pm 0,20$	Pb $2,80 \pm 0,32$	Pb $2,95 \pm 0,32$
HA200 G	Cu $0,94 \pm 0,02$	Cu $0,89 \pm 0,18$	Cu $1,52 \pm 0,2$
	Pb $1,09 \pm 0,10$	Pb $0,95 \pm 0,05$	Pb $1,20 \pm 0,12$
HA 200 piezas	Cu $0,70 \pm 0,14$	Cu $0,65 \pm 0,13$	Cu $0,57 \pm 0,20$
	Pb $1,40 \pm 0,13$	Pb $1,33 \pm 0,70$	Pb $1,37 \pm 0,16$
Coral	Cu $0,22 \pm 0,06$	Cu $0,28 \pm 0,12$	Cu $0,24 \pm 0,10$
	Pb $1,96 \pm 0,21$	Pb $1,88 \pm 0,41$	Pb $2,03 \pm 0,21$
Osteocoral	Cu $4,37 \pm 0,15$	Cu $3,37 \pm 0,10$	Cu $3,45 \pm 0,60$
	Pb $1,56 \pm 0,20$	Pb $1,42 \pm 0,51$	Pb $1,64 \pm 0,40$
Coral asteroides	Cu $13,30 \pm 1,78$	Cu $12,04 \pm 0,48$	Cu $11,80 \pm 0,55$
	Pb $7,75 \pm 0,46$	Pb $6,62 \pm 0,24$	Pb $6,87 \pm 0,41$

du Coprostanol des Sédiments de Surface. Relations avec l'Ecosystème Récifal (These Faculté de Sciences, Institut de Géologie, Neuchâtel, 77, 1992.

4. Boyne P.J., O'Leary T.J. and Cox C.F., Association reports, councils on dental

materials, instrument research, therapeutics, hidroxiapatite, beta tricalcium phosphate, and autogenous and allogenic bone for filling periodontal defect, alveolar ridge augmentation, and pulp capping. *JADA*, **108**, 822, 1984.

5. Socarrás E. and González R. Hidroxiapatitas y su aplicación clínica como nuevos materiales implantológicos en Cuba. Conferencia Científica del Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas, Ciudad de La Habana, Cuba, marzo, 1991.
6. González R. and López-Guerra J. Materiales bioactivos para implantes óseos. Características y aplicaciones. Editorial CENIC, Ciudad de La Habana, Cuba, 20, 1993.
7. Kawamura H., Tanaka G. and Ohyagi Y. *Spectrochim. Acta*, Part. B, **309**, 1973.
8. BroeKaert J.A.C. and Ttölg G. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **326**, 495, 1987.
9. Langmyhr F J. and Kjaus I. *Anal. Chim. Acta*, **100**, 139, 1978.
10. Kingston H.M. and Jassie L.B., Introduction to microwave sample preparation. Theory and Practice, Chapter 1, 1-4, 1988.
11. De Benzo Z., Velosa M., Ceccarelli C., De la Guardia M. and Salvador A. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **235**, 1991.
12. González R., Melo M.C., Pérez A., Rodríguez A.C. *Química Nova*, **16**, 6, 1993.
13. Alvarado J. and Petrola A. *Journal of analytical atomic spectrometry*, **4**, 411, 1989.