



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

**“EFECTO DE LAS CONDICIONES DE SÍNTESIS EN LA  
BIOCOMPATIBILIDAD DE ANDAMIOS TISULARES DE  
HIDROXIAPATITA”**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

**P R E S E N T A:  
CECILIA DE LEÓN ESCOBEDO**

**TUTOR PRINCIPAL:  
Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**Dra. Lucía Téllez Jurado**  
Departamento de Ingeniería Metalúrgica y de Materiales E.S.I.Q.I.E-I.P.N

**Dr. José Reyes Gasga**  
Instituto de Física, UNAM

**México, D.F., Julio 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Índice

Resumen .....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Objetivos e Hipótesis .....	5
<b>Capítulo I. Revisión de literatura .....</b>	<b>6</b>
1. 1 Biomateriales .....	8
1. 2 Biocerámicos .....	8
1.2.1 Clasificación de los biocerámicos.....	9
1.2.2 Fosfatos cálcicos.....	9
1.2.2.1. Hidroxiapatita (HA) .....	10
1. 3 Hidroxiapatita sintética.....	11
<b>Capítulo II. Materiales y Métodos .....</b>	<b>23</b>
2.1 Síntesis de hidroxiapatitas: HAb, HAm y HAS.....	23
2.2 Materiales y Reactivos .....	23
2.3 Caracterización estructural, microestructural y química.....	25
2.3.1 Espectroscopia infrarroja-trasformada de Fourier (FT-IR).....	25
2.3.2 Espectroscopia Raman (Raman).....	26
2.3.3 Análisis termogravimétrico (TGA).....	26
2.3.4 Difracción de Difracción de rayos X (DRX).....	26
2.3.5 Refinamiento por método de Rietveld.....	26
2.3.6 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	27
2.3.7 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	27
2.3.8 Área superficial específica Brunauer-Emmett-Teller (BET).....	27
2.3.9 Análisis elemental de plasma óptico (ICP-OES).....	27
2.4 Respuesta de biocompatibilidad.....	27
2.4.1 Preparación de andamios para las muestras: HAb, HAm y HAS .....	28
2.4.2 Cultivo celular .....	28
2.4.3 Ensayo de proliferación celular / viabilidad .....	28
2.4.4 Fosfatasa alcalina .....	29
2.4.5 Diseño estadístico.....	30
<b>Capítulo III. Resultados y Discusión .....</b>	<b>30</b>
3.1 Espectroscopia Infrarroja .....	30
3.2 Espectroscopia Raman .....	32
3.3 Análisis Termogravimétrico .....	33
3.4 Difracción de Difracción de rayos X .....	35
3.5 Refinamiento con Rietveld.....	37
3.1 Microscopía de barrido .....	40
3.2 Microscopía de transmisión.....	43

3.3 Superficie específica.....	46
3.4 Análisis elemental .....	47
3.5 Pruebas biológicas.....	48
3.6 Proliferación .....	48
3.7 Fosfatasa alcalina .....	50
Conclusiones .....	53
Perspectiva a futuro.....	54
Apéndice 1 .....	55
Apéndice 2 .....	56

## Índice de Figuras

Figura 1. Esquema histórico en aplicaciones biomédicas de los materiales metálicos, poliméricos y cerámicos.....	7
Figura 2. Elementos verticales de simetría del grupo espacial $P6_3/m$ .....	11
Figura 3. Esquema con los distintos mecanismos de agitación.....	23
Figura 4. Esquema de síntesis para las muestras HAb, HAm y HAs.....	25
Figura 5. Espectros infrarrojos hidroxiapatita: a) HAb; b)HAm; c) HAs.....	30
Figura 6. Espectroscopia Raman de la hidroxiapatita: a) HAb; b) HAm; c) HAs .....	33
Figura 7. Análisis termogravimétrico: a) HAb; b) HAm; c) HAs .....	35
Figura 8. Patrones de difracción de difracción de rayos X: a) HAb; b)HAm; c) HAs .....	36
Figura 9. Difracción de Difracción de rayos X pico correspondiente al plano ( 0 0 2 ) de muestras: a) HAb; b) HAm; c) HAs .....	37
Figura 10. Análisis Rietveld en los difractogramas de las muestras: a) HAb; b) HAm; HAs. Los datos experimentales se indican con cruces rojas y el perfil calculado se muestra con la línea negra continua. Las líneas negras verticales localizadas debajo de los patrones de difracción corresponden a las reflexiones de Bragg.....	38
Figura 11. Micrografías de las muestras: a) HAb; b) HAm; c) HAs.....	41
Figura 12. Tamaño de partícula muestras: a) HAb; b) HAm; c)HAs.....	42
Figura 13. Micrografías con microscopia electrónica de transmisión de muestras de hidroxiapatita: a) HAb; b) HAm; c) HAs.....	43
Figura 14. Patrones de difracción TEM muestras: a) HAb; b) HAm; c) HAs.....	44
Figura 15. Tamaño promedio cristal por MET .....	45
Figura 16. Proliferación de células mesenquimales sobre andamios de hidroxiapatita: HAb, HAm y HAs, después de 3, 5, 7, 14 y 21 días de cultivo. Las muestras HAb, HAm y HAs, presentan diferencia significativa (* < 0.05) comparada con la muestra control (CP = 100 %). .....	48

Figura 17. Análisis de fosfatasa alcalina en células mesenquimales sembradas sobre andamios de hidroxiapatita (HAb, HAm y HAs), después de 3, 5, 7, 14 y 21 días de cultivo. La muestra HAs al día 7 de cultivo mostró diferencia significativa ( $* < 0.05$ ) comparada con la muestra control. ....	51
Figura 18. Micrografías de barrido de posible material mineralizado sobre las muestras: a) HAb; b) HAm; c) HAs.....	52
Figura 19. Diseño de un espectro FTIR .....	56
Figura 20. Esquema de dispersión de la luz.....	57
Figura 21. Fuente de rayos-X.....	59
Figura 22. Señales que se producen durante la interacción del haz electrónico con la muestra .....	60
Figura 23. Esquema de ensamble de plasma acoplado inductivamente .....	61

## Índice de Tablas

Tabla 1. Comparación de distintos mecanismos de síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita (M. Sdat-Shojai 2013). ....	18
Tabla 2. Reactivos utilizados para la síntesis .....	23
Tabla 3. Asignación de bandas Raman para las muestras HAb, HAm y HAs .....	32
Tabla 4. Análisis Térmico .....	34
Tabla 5. Tamaño de cristal promedio muestras: HAb, HAm y HAs, con refinamiento Rietveld.....	39
Tabla 6. Tamaño promedio de cristal promedio con TEM y refinamiento Rietveld .....	46
Tabla 7. Comparación de la superficie específica de muestras: HAb, HAm y HAs, con tamaños de partícula y tamaño promedio de cristal.....	47
Tabla 8. Análisis químico calcio / fósforo .....	47

## Resumen

En este trabajo se presenta el estudio de los efectos por el método de co-precipitación, en las propiedades estructurales, microestructurales de la hidroxiapatita, y sus efectos en la interacción célula-hidroxiapatita. Se sintetizaron tres polvos de hidroxiapatita, HAb, HAm y HAs bajo tres mecanismos de agitación, baño de ultrasonido (HAb), agitación magnética (HAm) y agitación por ultrasonido de alta frecuencia (HAs), respectivamente. Los materiales obtenidos fueron caracterizados utilizando técnicas de espectroscopia infrarroja, espectroscopia Raman, análisis termogravimétrico, difracción de rayos-X, refinamiento con Rietveld, microscopia electrónica de barrido y de transmisión, medición de área superficial y análisis elemental Ca/P. Y por último se realizó el análisis de proliferación y fosfatasa alcalina. Como resultado de las técnicas de caracterización, se obtuvieron nanopartículas de hidroxiapatitas deficientes en calcio, con presencia de grupos  $\text{CO}_3^{2-}$  que sustituyen a los grupos fosfatos  $\text{PO}_4^{3-}$  (apatita tipo B). Finalmente de acuerdo a los resultados de proliferación y fosfatasa alcalina (ALP), las muestras HAb y HAs fueron las que mejores resultados presentaron.

## **Abstract**

In this work the aim of study was structural and microstructural effects of hydroxyapatite synthesized by co-precipitation under different stirring mechanisms, and the cell-material interaction. Three powders of hydroxyapatite HAb, HAm and HAs were synthesized by co-precipitation, assisted by three different stirring mechanisms: ultrasonic bath (sample HAb), magnetic-plate-and-“butterfly” stirring (sample HAm), and ultrasonic tip/ultrasonic bath (HAs). The synthesized powder samples were characterized by infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, thermogravimetric analysis, X-Ray diffraction, Rietveld refinement, scanning and transmission electron microscopy, measurement of specific surface area and elemental analysis (ICP-OES). Subsequently proliferation and alkaline phosphatase (ALP) analyses were done for samples HAb, HAm and HAs. Afterwards the results obtained from the different techniques of characterization above mentioned, provides results since deficient nano powders of calcium hydroxyapatites were achieved with the presence of carbonate ions that substitutes phosphate ions (apatite Type B). Thereafter, according to proliferation and ALP assay samples HAb and HAs were those that exhibit better proliferation results and ALP assay, respectively.

## Introducción

Debido al incremento de la población adulta de más de 60 años (De Pavía-Mota E. 2005), los altos costos de salud, así como la falta de órganos y métodos terapéuticos eficaces, el campo de la medicina se ha visto en la necesidad de moverse hacia campos de ciencia e ingeniería de materiales, para el desarrollo de materiales y/o dispositivos que aumenten y mejoren la calidad de vida en los pacientes; y de esta manera, evitar un colapso a corto plazo a nivel salud global (S. Salmasi 2015). Por lo anterior, en años recientes, la ingeniería de tejidos ha crecido rápidamente, con lo que respecta a investigaciones relacionadas con el diseño de tejidos artificiales, tales como: cartílago, ligamento, músculo y hueso (K. Worley 2012). La hidroxiapatita es un componente mineral inorgánico, de fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , que constituye una de las fases importantes del hueso humano, comprende entre un 65-70 % de uno o más tipos de fosfato de calcio (C. C. Silva 2003) (M. Sdat-Shojai 2013). Ha sido ampliamente utilizado como material biomédico, debido a sus características de biocompatibilidad, osteoconducción y bioactividad (osteoinducción), considerándose como el biocerámico más adecuado para implantes de sustitución en tejidos duros (G. Lehmann 2012) (T. M. Sridhar 1997) (Akkaya 2013). Por lo cual, es un material de interés para contribuir en la mejora de materiales biomédicos. Particularmente, se ha dado énfasis en las modificaciones superficiales (morfología, cristalinidad, tamaño de partícula, superficie específica, composición, estequiometría, entre otras.) de las apatitas, debido a que propician una buena respuesta celular en el biomaterial de implante, incrementa el tiempo de vida del mismo y por lo tanto disminuyen las intervenciones quirúrgicas como la prótesis de rodilla, prótesis de cadera, maxilofacial, entre otras (M. Muñoz Gómez 2001).

Estudios realizados con hidroxiapatita, han demostrado que la modificación química y/o física del mineral, son de importancia crítica para su optimización en aplicaciones dentro del área biomédica; dichas modificaciones pueden ser a nivel de tamaño de partícula, método de síntesis, morfología, composición de fase y estequiometría, entre otras (J. I. D. Gopi 2012) (K. Lin 2011) (N. Vargas Becerril 2013) (P. X. X. Guo 2005). Cabe destacar que la interacción célula-hidroxiapatita como material de implante, sugieren una estrecha dependencia en los cambios físicos y/o químicos presentes en el cristal de la hidroxiapatita. Debido a esto, en el diseño de un material o un dispositivo, las propiedades superficiales son aspectos clave para determinar el éxito del implante en la biomedicina, ya que la mayoría de las reacciones biológicas en el cuerpo humano, se producen en las superficies y las interfaces (S. Salmasi 2015). De ahí que el proceso de síntesis para obtener la hidroxiapatita, juegue un papel relevante sobre las características físico-químicas del material.

Por tal motivo, se han realizado investigaciones, para tratar de modificar propiedades superficiales como la morfología, tamaño de cristal, las fases presentes en el material y el grado de cristalinidad (J. I. D. Gopi 2012), utilizando diferentes técnicas de síntesis tales como precipitación, sol-gel, hidrotermales, métodos, estado sólido, entre otros (K. Lin 2011) (K. Y.-J. V. Dhand 2014). En donde, con base en revisiones realizadas durante las últimas décadas, el método más empleado ha sido el de co-precipitación, ya que es un proceso de síntesis sencillo y barato, donde, los niveles de conversión son elevados y es posible controlar la morfología y tamaño de partícula (J. I. D. Gopi 2012) (M. Sdat-Shojai 2013) (P. X. X. Guo 2005) (X. Gou 2007) (L. B. Kong 2002) (T. F.-a. Y. Sun 2011).

El proceso de síntesis típico de co-precipitación, implica la adición de un reactivo en disolución gota a gota en otra disolución que se encuentra en agitación continua, mientras se lleva a cabo la reacción. Posteriormente, el precipitado logrado se deja envejecer o éste es filtrado y lavado, para finalmente secarse y triturarse (M. Sdat-Shojai 2013). En este proceso, la agitación es uno de los pasos importantes de la síntesis, ya que durante la reacción se propicia la dispersión de aglomerados en el material, la nucleación, crecimiento del cristal, crecimiento de fases sólidas, modificación morfológica de la partícula y se obtienen hidroxiapatitas deficientes en calcio, lo que se asemeja a las apatitas biológicas, que presentan una relación  $Ca/P < 1.67$  (Z. Zou 2012) (M. Mohebbali 2011) (W. Kim 2001) (F. Castro 2013) (M. Nabil Salimi 2012) (Regí 2010). Luego entonces, los diversos mecanismos de agitación, tales como baño de ultrasonido, agitación magnética y ultrasonido de alta frecuencia, son de interés para estudiar las diferentes características físico-químicas que se pueden lograr en el mineral, de acuerdo al tipo de agitación utilizada, y sus efectos en la interacción célula-hidroxiapatita. Se han llevado a cabo estudios con respecto a los efectos de agitación a nivel estructural y microestructural para la síntesis de la hidroxiapatita, y fue posible obtener bajo tres mecanismos de agitación magnética, baño de ultrasonido y ultrasonido de alta frecuencia, tamaños de partícula nanométrico y morfologías diferentes entre sí (N. Vargas Becerril 2013) (M. Nabil Salimi 2012) (F. A. M. de Campos 2007) (M. A. Giardina 2010).

Por consiguiente, y debido a lo antes mencionado, en este trabajo se estudiará, el efecto del método co-precipitación asistido con tres mecanismos agitación (agitación magnética, agitación por baño de ultrasonido y agitación por ultrasonido de alta frecuencia), en las propiedades estructurales y microestructurales de la hidroxiapatita, y entender el efecto que presenta a nivel morfología del cristal sobre la respuesta de biocompatibilidad, interacción célula-material.

## Objetivos e Hipótesis

### Objetivos

#### Objetivo General

Analizar el efecto del método co-precipitación asistido bajo tres mecanismos agitación, en las propiedades estructurales, microestructurales de la hidroxiapatita, y sus efectos en la respuesta de biocompatibilidad.

#### Objetivos Particulares

- Caracterizar la hidroxiapatita sintetizada por co-precipitación utilizando tres mecanismos de agitación, mediante las técnicas de FT-IR, Raman, difracción de rayos X, refinamiento Rietveld, MEB, MET, SSA por su siglas en inglés specific Surface área y análisis elemental Ca/P.
- Caracterizar la respuesta de biocompatibilidad de la hidroxiapatita sintetizada por el método de co-precipitación utilizando tres mecanismos de agitación.

### Hipótesis

Se sabe que, la hidroxiapatita como hueso sintético es un excelente candidato como material de implante debido a sus propiedades biológicas. Por lo que sigue siendo un material de interés de estudio. Particularmente, se ha dado énfasis a las modificaciones superficiales (físico-químicas) de apatitas, ya que estas influyen, en gran medida, en la respuesta biológica. Entonces, sintetizar biocerámicas de hidroxiapatita por co-precipitación utilizando distintos mecanismos de agitación, favorecerá la respuesta biológica in vitro en los andamios tisulares de hidroxiapatita.

## Capítulo I. Revisión de literatura

La ciencia e ingeniería de los materiales puede subdividirse en dos disciplinas, ingeniería de materiales y ciencia de materiales. Esta última, se encarga de investigar la relación existente entre la estructura, propiedades, y procesamiento de los materiales. Lo anterior con fines de desarrollar o sintetizar nuevos materiales. Mientras que, la ingeniería de materiales, se refiere principalmente a la utilización del conocimiento fundamental y aplicaciones de los materiales, de tal manera que puedan ser convertidos en productos como uso de consumo, dentro de distintos rubros. También, la ingeniería de materiales, se encarga de diseñar nuevos métodos a los ya existentes, para producir un conjunto predeterminado de propiedades en el material, y / o desarrollar técnicas para la producción de los materiales (William D. Callister 2007).

Dentro de la ciencia e ingeniería de materiales encontramos la disciplina de los biomateriales; la cual, se fundamenta en el conocimiento de la ciencia de materiales, en conjunción con la física, química y la clínica de las ciencias biológicas, con la finalidad de lograr una buena interacción entre el material y el huésped. En este sentido, los biomateriales son un excelente ejemplo de campo pluridisciplinario, donde el material, desarrollado por científicos e ingenieros de materiales tiene que ser validado para desempeñar su tarea en el interior del cuerpo humano, por médicos y biólogos experimentados; siendo el resultado final, analizado y coordinado por todos los científicos involucrados (Regí 2010). Las ciencias de la física, biología y química, son parte integral de campo de ciencia e ingeniería de los materiales. La integración de estas tres ciencias básicas se observa claramente en la industria para dispositivos biomédicos y en el área de biotecnología, donde se busca el mejoramiento de dispositivos que tendrán una aplicación en el campo de la ortopedia y en la búsqueda de la regeneración de los tejidos del cuerpo humano (López 2012).

Los materiales, se pueden clasificar de manera general en: cerámicos, polímeros y metálicos. Dicha clasificación está en función de propiedades estructurales y mecánicas, entre otras (Askeland 1998) (Williams 2009).

Los materiales metálicos, son sustancias inorgánicas compuestos de uno o más elementos metálicos y/o no metálicos. Como ejemplo de elementos metálicos son hierro, cobre, aluminio y titanio. Como elementos no metálicos carbono, nitrógeno y oxígeno, que también pueden estar contenidos en los materiales metálicos. Los metales están constituidos por una estructura cristalina, en la que los átomos están dispuestos de manera ordenada. Los metales son buenos conductores térmicos y eléctricos, también son relativamente fuertes y dúctiles a temperatura ambiente y muchos mantienen una buena resistencia a altas temperaturas. Los metales en sus formas de aleados y puros se utilizan

en numerosas industrias así, por ejemplo la biomédica, aeroespacial, electrónica, ingeniería civil, electrónica, energética, y transporte (William D. Callister 2007). Los materiales metálicos fueron de los primero en utilizarse en el área de biomateriales. Tal es el caso del acero inoxidable que fue el primer material utilizado como implante en el campo quirúrgico (Niinomi 2002). El esquema de la <sup>1</sup>Figura 1, se muestra en el tiempo los inicios de algunos materiales (metálicos, poliméricos y cerámicos), en aplicaciones biomédicas.

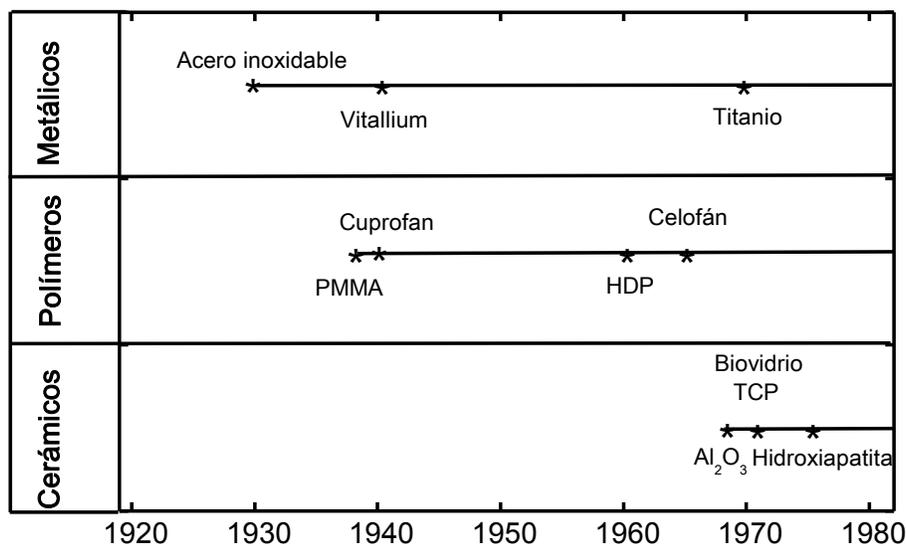


Figura 1. Esquema histórico en aplicaciones biomédicas de los materiales metálicos, poliméricos y cerámicos

En su mayoría, los materiales poliméricos, son compuestos orgánicos constituidos generalmente por carbono, que contienen además, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, y se componen por cadenas o redes moleculares largas. La mayoría de los polímeros muestran estructuras amorfas, sin embargo, hay algunos que tiene mezclas de material cristalino y amorfo. Debido a su estructura interna, los polímeros son malos conductores de la electricidad, y por lo tanto, algunos son buenos aislantes. En cuanto a sus propiedades mecánicas, éstas son diversas entre los tipos de materiales poliméricos (S. Ramakrishna 2001).

Los materiales cerámicos, son compuestos inorgánicos formados por elementos metálicos y no metálicos enlazados químicamente. Estructuralmente los materiales cerámicos pueden ser cristalinos y/o amorfos. También, resisten altas temperaturas, son materiales

<sup>1</sup> Vitallium es una aleación de cobalto, molibdeno y cobre. Cuprofan es un polímero derivado de la celulosa utilizado como membrana de diálisis. PMMA polimetilmetacrilato. HDP por sus siglas en inglés high density polymer. TCP por sus siglas en inglés Tricalcium Phosphate.

duros, sin embargo tienden a ser frágiles. Éstos materiales son típicamente aislantes del calor y electricidad (William D. Callister 2007) (Askeland 1998).

### **1.1 Biomateriales**

Los biomateriales, son sustancias que han sido diseñadas para tener una forma, que solo o como parte de un sistema complejo, se utiliza para dirigir, mediante el control de las interacciones con los componentes de los sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o de diagnóstico en humanos o en la medicina veterinaria (M. Vallet Regí 2011). En otras palabras, un biomaterial es cualquier material biocompatible, natural o sintético, que se utiliza para reemplazar o ayudar en la regeneración de un organismo o tejido, mientras está en contacto directo con el medio circundante. El diseño y la selección de los biomateriales dependen de su aplicación médica específica, para que funcionen de forma segura y apropiada durante un largo periodo de tiempo dentro del organismo sin ser rechazados. Es por ello, que existen factores de importancia a considerar en un biomaterial tales como: características químicas, biológicas, mecánicas, biocompatibilidad (no tóxico), bioactividad, biodegradabilidad, bioestabilidad, entre otros (Q. Chen 2015) (S. Ramakrishna 2001). Por lo anterior, los biomateriales, pensados como dispositivos médicos, tienen como función última mejorar la calidad de vida de los pacientes.

### **1.2 Biocerámicos**

Durante los últimos 40 años, los avances más significativos en el desarrollo de materiales con aplicaciones biomédicas, ha sido en la innovación de materiales cerámicos para la reconstrucción y regeneración ósea. Esta clase de implantes médicos se conocen como biocerámicos. El uso de los biocerámicos se ha concentrado mayormente en implantes ortopédicos y dentales. Lo anterior debido a que los materiales que se han desarrollado son los más biocompatibles y pueden obtenerse con propiedades bioestables, bioactivos o reabsorbibles. Lo cual, puede llevar a imitar las características del tejido mineral esquelético y dental (López 2012) (S. M. Best 2008) (Regí 2010).

Los materiales cerámicos, son los más biocompatibles y pueden obtenerse con propiedades bioestables, bioactivos o reabsorbibles (Regí 2010), por tal razón, éstos se utilizan en el área biomédica. Algunos ejemplos de materiales cerámicos: óxido de aluminio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), sílice ( $\text{SiO}_2$ ), nitrato de silicón ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) y óxido de hierro (II, III)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Por otro lado, se han desarrollado materiales médicos innovando con los materiales cerámicos, para la reparación y reconstrucción esquelética. Esta clase de materiales, se refieren a menudo como biocerámicos, y su popularidad en aplicaciones biomédicas se ha observado por el

aumento en el número de patentes, publicaciones, y conferencias internacionales. Como ejemplo de biocerámicos: hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), hidroxiapatita deficiente en calcio (Ca-def-HA,  $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$ ), fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3$ ), fluoroapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F})_2$ ), Cloroapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{Cl})_2$ ), Wollastonita ( $\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$ ), entre otros (M. Vallet Regí 2011) (M. Vallet-Regí 1997).

La hidroxiapatita deficiente en calcio (Ca-def-HA) es un tipo de material que constituye la parte mineral del tejido más duro en los seres humanos, además la relación atómica calcio / fósforo es menor a la hidroxiapatita estequiométrica ( $\text{Ca}/\text{P} < 1.67$ ) (Michele lafico 2014). Su estructura y propiedades, juegan un papel importante en el proceso de biomineralización dentro de los organismos vivos. En consecuencia, es un material utilizado como implante médico para la reparación y reconstrucción del tejido óseo dañado (S. M. Best 2008).

### 1.2.1 Clasificación de los biocerámicos

- i) Bioactivos: La capacidad del material de unirse directamente al hueso sin la interposición de una cápsula fibrosa (M. Vallet Regí 2011). Los cuales a su vez se dividen en:
  - a. Reabsorbibles o Biodegradables: Materiales que al ser implantados se disuelven en función del tiempo, y son reemplazados por tejido natural.
  - b. No-reabsorbible: Materiales que al ser implantados permanecen con el tiempo.
- ii) Bioinertes: Son aquellas cerámicas que al ser implantadas no llevan a una respuesta celular ni reaccionan apreciablemente con el medio. Es un término que debe ser utilizado con cuidado, ya que todo material introducido en un ambiente fisiológico puede responder dependiendo de su superficie, sin embargo, de acuerdo a los propósitos biomédicos, dicho término se define como un nivel mínimo de respuesta del tejido celular circundante (López 2012) (S. M. Best 2008).

### 1.2.2 Fosfatos cálcicos

Como se mencionó, los fosfatos de calcio que son el componente mineral del hueso. Se pueden clasificar de acuerdo a la proporción de iones fosfatos y carbonatos presentes en la estructura del material. Se dividen en tres grupos: (i) apatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_X_2$ , la cual incluye a la hidroxiapatita ( $X=\text{OH}^-$ ), uno de los fosfatos de calcio sintéticos más utilizados  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , debido a las similitudes químicas con el componente inorgánicos de los tejidos duros (Joyce Y Wong 2013), y la fluorapatita ( $X=\text{F}^-$ ). En este mismo grupo también se encuentran las apatitas tipo fosfato octacálcico (FOC)  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y el fosfato tetracálcico (FTC)  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ ; (ii) fosfato tricálcico  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; (iii) y por último los compuestos que contienen grupos Ca- $\text{PO}_4$  los cuales incluyen fosfato de calcio dihidratado

(Brushita)  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , fosfatos de dicalcio anhidros (FDC)  $\text{CaHPO}_4$ , por último fosfatos ácido de calcio  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  (M. Mathew 2001).

### 1.2.2.1. Hidroxiapatita (HA)

La hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , es una biocerámica con características químicas y estructurales similares a la fase mineral del hueso y el diente, ha sido ampliamente utilizado para implantes dentales y en ortopedia.

La hidroxiapatita tiene estructura hexagonal con grupo espacial  $P6_3/m$  y parámetros de red  $a = b = 0.94166 \text{ nm}$ ,  $c = 0.68745 \text{ nm}$  (J. M. Hughes 1989). Cuenta con tres elementos de simetrías verticales, como se muestra en la Figura 2, 1) ejes senario-ternario helicoidales que pasan por los vértices de la celda unidad. Estos elementos de simetría son equivalentes a ejes ternarios con la superposición del eje binario helicoidal; 2) tres ejes ternarios que pasan a través  $2/3$ ,  $1/3$ , 0 y  $1/3$ ,  $2/3$  y 0; y 3) ejes binarios helicoidales que pasan por la mitad de las aristas y el centro de la celda unidad.

Hay columnas de iones calcio  $\text{Ca}^{2+}$  espaciadas  $1/2$  del eje  $c$  a lo largo de tres ejes ternarios a  $1/3$ ,  $2/3$ , 0 y  $2/3$ ,  $1/3$  y 0, estos iones representan un 40% de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en la estructura, éstos iones se designan Ca1, y corresponden a la posición de Wyckoff  $f$  con multiplicidad 4 y grupo puntual  $C_3$ . Asimismo la columna de iones Ca1 tiene un número de coordinación de nueve átomos de oxígeno, los cuales están vinculados con los oxígenos de los tetraedros que forman los iones  $\text{PO}_4^{3-}$ . Los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  restantes forman 2 grupos de triángulos (Ca2) girados  $60^\circ$  uno del otro alrededor del eje  $c$ , centrados sobre los planos espejo a  $z = 1/4$  y  $z = 3/4$ , estos corresponden a la posición Wyckoff  $h$  con multiplicidad 6. Estos iones Ca2 tienen un número de coordinación 7, seis átomos de oxígeno con un ion  $\text{OH}^-$ . Por último los iones  $\text{OH}^-$  se encuentran en los vértices de la celda unidad y rodeados por los átomos Ca2 a lo largo del eje  $c$  como se muestra en la Figura 2 (M. Mathew 2001) (Elliot 1994).

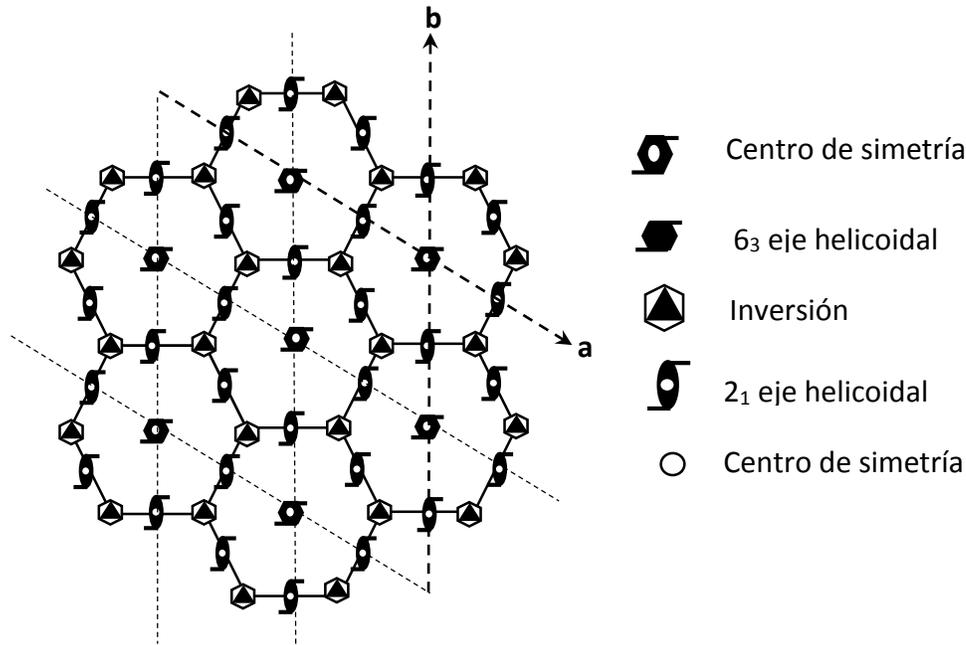


Figura 2. Elementos verticales de simetría del grupo espacial P6<sub>3</sub>/m

La hidroxiapatita deficiente en calcio (def-Ca-HA) es un tipo de apatita biológica, que es el componente inorgánico principal de los tejidos duros del ser humano. Tiene una buena capacidad para unirse químicamente con los huesos naturales, es biocompatible, bioactivo, no tóxico. Promueve la formación y remodelación ósea (H. Wang 2014), debido a sus similitudes con la fase mineral del hueso y la dentina. También la def-Ca-HA y el hueso son parecidas en la relación atómica calcio / fósforo, la cual es inferior a 1.67, lo que quiere decir que son no estequiométricas (M. Vallet-Regí 1997) (K. Ishikawa 1993). En el área biomédica, tienen una variedad de aplicaciones como: relleno de defectos óseos, recubrimiento en implantes metálicos, reconstrucción maxilofacial, tratamiento en defectos óseos, tratamiento en fracturas y aumento de hueso de rebordes mandibulares (S. M. Best 2008).

### 1.3 Hidroxiapatita sintética

En la hidroxiapatita sintética, se ha buscado modificar bajo distintos mecanismos de síntesis las características físicas y químicas tales como; tamaño de cristal, área superficial, topografía, química o energía superficial del material. Con el objeto de mejorar las características de interacción entre el material implantado y las células (X. Gou 2007) (Anselme 2000).

Se han empleado varios métodos de síntesis para modificar las características físico-químicas de la hidroxiapatita, tales como, reacción mecanoquímica, sol-gel, estado sólido, co-precipitación, ultrasonido y combinaciones entre alguno de los métodos. A continuación, se presentan algunas referencias donde se describen la variedad de métodos de síntesis y se presentan algunos resultados.

L. B. Kong, et al. (2002) sintetizaron hidroxiapatita por método co-precipitación, utilizando como sal precursora nitrato de calcio y ácido fosfórico logrando obtener tamaños de partícula nanométricos entre 50-70 nm y área superficial específica de 62 m<sup>2</sup>/g.

Y. Han, et al. (2009) sintetizaron hidroxiapatita con hidróxido de calcio y fosfato diácido de calcio utilizando agitación de alta frecuencia. Como resultado, obtuvieron un tipo de apatita carbonatada con partículas nanométricas en forma de nanotubos, con diámetro de partícula entre 10-20 nm y longitudes de 20-50 nm.

M. N. Salimi, et al. (2013) sintetizaron hidroxiapatita por el método sol-gel, las sales precursoras utilizadas en la reacción fueron nitrato de calcio tetrahidratado [Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O] y fosfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, variando las velocidades de agitación 200, 400 y 600 rpm. De acuerdo a las micrografías, se observaron tamaños de cristal nanométrico para todas las muestras.

R. Barabás, et al. (2013) sintetizaron hidroxiapatita y composites con hidroxiapatita utilizando distintos mecanismos de síntesis, para comparar entre éstas los tamaños de partícula y de morfología. En este trabajo, obtuvieron partículas con tamaños nanométricos utilizando el método de co-precipitación y con la técnica de difracción de rayos X obtuvieron tamaño nanométrico del cristal 2.5-9.2 nm.

M. Nabil Salimi, et al. (2012) sintetizaron hidroxiapatita por método sol-gel con el objetivo de estudiar los efectos debido a las velocidades de agitación y temperaturas en el tamaño de partícula. Las sales precursoras utilizadas fueron Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O y P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Las velocidades de agitación fueron 200 rpm, 1200 rpm, 2200rpm, 3000 rpm y 7000 rpm. Lograron obtener la fase de hidroxiapatita en todas las muestras. Y se observó por microscopía, elongación de las partículas conforme se fue incrementando la velocidad de agitación. Y los tamaños de partícula disminuyeron al aumentar las velocidades de agitación.

X. Guo P. X., et al. (2006), sintetizaron hidroxiapatita por el método hidrotermal haciendo modificaciones en las concentraciones del disolvente isopropanol-agua. Con el objetivo de estudiar la influencia del isopropanol en la cristalinidad del material, composición química, evolución de la fase y aglomerados en la hidroxiapatita.

Las fase de HA se confirmó para las distintas concentraciones. Con respecto al grado de cristalinidad, ésta disminuyo conforme se aumentó la concentración del isopropanol.

La superficie específica de las muestras varió desde 46.9 hasta 80 m<sup>2</sup>/g, lo que se atribuye al agua y CO<sub>2</sub> absorbido y también a la pérdida de masa. Con la morfología de las muestras se observó un aumento en la relación  $t_{002}/t_{300}$  a medida que se incrementó la concentración del isopropanol. Por lo anterior el efecto de concentración isopropanol-agua afecta en el grado de cristalinidad de las partículas de hidroxiapatita.

T.J. Webster, et al. (2000) sintetizaron hidroxiapatita por el método húmedo, controlando el tamaño de partícula con tiempo y temperatura durante el proceso de precipitación, obteniendo un tamaño promedio de partículas menores a 100 nm. Lo anterior con objeto de comparar el crecimiento de osteoblastos con cerámicas convencionales (tamaño de partícula mayor a 100 nm). Los resultados del estudio in vitro realizados evidencian mejora de funciones a largo plazo (proliferación celular, síntesis de fosfatasa alcalina, y concentración de calcio en la matriz extracelular) de los osteoblastos en nanocerámicos.

X. Guo J. E., et al. (2006) sintetizaron hidroxiapatita por método hidrotérmico y precipitación. Para obtener tamaños de partícula nanométricos (NHA), se utilizó SPS (Spark plasma sintering) por sus siglas en inglés y los tamaños de partícula microestructuradas (MHA) se obtuvieron mediante sinterizado convencional. Las pruebas de caracterización realizadas fueron: difracción de rayos X, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, microscopía electrónica de barrido y de transmisión de electrones, y microscopía de fuerza atómica. Para posteriormente realizar pruebas de adhesión, proliferación y mineralización con osteoblastos.

A partir de las técnicas de caracterización, el difractograma corresponde a la monofase hidroxiapatita. Mientras que la banda obtenida por infrarrojo, de ambos polvos, presentaron los grupos funcionales característicos en la apatita: fosfatos, hidroxilos y carbonatos. Referente a las micrografías, las morfologías que presentaron las muestras NHA y MHA fueron de nanopartículas y aciculares, respectivamente. Finalmente, de acuerdo a las pruebas celulares, la muestra NHA promueve la primera etapa de unión celular, adhesión y proliferación. Además, promueve a largo plazo proliferación y diferenciación celular.

F. Nagata, et al. (2013) investigaron la adsorción de proteínas, en diferentes morfologías de hidroxiapatita. Las nanopartículas de hidroxiapatita se obtuvieron por método hidrotérmico utilizando fosfato ácido de amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>] y nitrato de calcio tetrahidratado [Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O], variando temperaturas y pH. Se sintetizaron 2 grupos de muestras, en el primer grupo se controló el pH de las muestras a 10 y en el segundo no se controló el pH. En ambos grupos, se utilizaron 4 diferentes temperaturas 25, 60, 120 y 180 °C para la síntesis. Los tamaños de partícula obtenidos en todas las muestras fueron nanométricas.

Las micrografías mostraron morfologías tipo nanotubos en las muestras sin control de pH, en las muestras de pH 10 la morfología fue granular, y por último, las partículas en la muestra con fase DCPD presentaron morfología en láminas. Con respecto a la adsorción de proteínas, se observó que conforme aumenta el grado de cristalinidad de la muestra hay mejor adsorción. Lo anterior sugiere, que la adsorción de entre diversos tipos de proteínas y la hidroxiapatita de alta cristalinidad, cambian por los sitios de unión de la hidroxiapatita.

M. A. Martins, et al. (2008) obtuvieron hidroxiapatita con tamaños nanométricos a partir de disoluciones calcio/citrato/fosfato y variando el pH entre 7.43 y 8.46. Con el objetivo de estudiar la influencia de las condiciones de síntesis, en la nucleación y crecimiento de partículas. Asimismo los efectos de adsorción del citrato en el tamaño y forma de partículas. Utilizaron 4 reactivos: ácido cítrico monohidratado, nitrato de calcio, fosfato ácido amonio y disolución de amonio. La síntesis se llevó a cabo a la temperatura de 37 °C por precipitación y variando el pH de 7.43 a 8.46, dando lugar a síntesis de 6 muestras.

La difracción de rayos X mostro presencia de la fase de hidroxiapatita en todas las muestras, sin presencia de fases secundarias. La relación Ca/P de las muestras varía 1.8-2.1, por arriba del 1.67. Lo anterior se puede atribuir a los citratos que podrían haber formado complejos de calcio-citratos. La prueba de difracción de rayos X arrojó que las muestras tienen material amorfo. De acuerdo a las micrografías, se observó que al aumentar el pH hay una disminución significativa en los tamaños de partículas. Asimismo con la superficie específica, se presentó el mismo comportamiento, conforme aumenta el pH el área específica es mayor.

S. H. Zhu, et al. (2004) sintetizaron hidroxiapatita por el método de precipitación hidrotérmico, obteniendo tamaños de partícula entre 40-60 nm, para posteriormente sembrar células gástricas cancerígenas y evaluar su biocompatibilidad. Se obtuvieron tamaños nanométricos de cristales de hidroxiaptita, que se midieron por microscopia electrónica de transmisión. Sin observarse efectos adversos en los polvos de hidroxiapatita en las pruebas de viabilidad y crecimiento celular.

A. Haider, et al. (2014), sintetizaron hidroxiapatita por precipitación (nHA) para posteriormente formar nanofibras con PLGA poly(latic-coglycol acid), por sus siglas en inglés, a través del método electrohilado, con el objetivo, de evaluar los efectos en las diferentes morfologías en la adhesión, expansión y proliferación celular contra una hidroxiapatita adquirida de manera externa (sHA).

Obtuvieron la fase de hidroxiapatita por difracción de rayos X, en los dos materiales, sHA y nHA. Con espectroscopia infrarroja se identificaron las bandas de fosfatos, carbonatos e hidroxilos, correspondientes a la apatita, y también se identificaron las bandas características del PLGA. Con microscopia de barrido fue posible determinar que los

tamaños de partículas eran nanométricos, y su morfología de nanotubos en la muestra nHA y forma redonda para la muestra sHA. Para finalizar las pruebas de biocompatibilidad, de la muestra nHA mostrará una mayor adhesión, proliferación y diferenciación con respecto a la muestra sHA. Por lo anterior los efectos en la morfología son clave en la respuesta celular.

S. Inthong, et al. (2013) sintetizaron polvos finos de hidroxiapatita por método coprecipitación asistida con agitación de ultrasonido. Con el objetivo de estudiar los efectos del pH en la formación y morfología de los polvos de hidroxiapatita.

De acuerdo a la difracción de rayos X, se obtuvo fase de hidroxiapatita para las muestras con de pH entre 5 y 11, mientras que la muestra con pH 4 no presentó la fase correspondiente a la hidroxiapatita. Con microscopia de barrido se observó aumento en aglomerados conforme aumenta el pH. Además conforme aumenta el pH la morfología de las muestras es más redondeada. Cabe mencionar, que no se observó correlación entre el grado de cristalinidad y el pH de las muestras. La muestra con mejor resultado de dureza fue la apatita con pH  $9.606 \pm 0.25$  GPa, lo anterior podría atribuirse a la muestra con mayor densidad  $3.04 \pm 0.08$  g/cm<sup>3</sup>. Finalmente la prueba de bioactividad que se realizó a todas las muestras, fue el análisis del fluido corporal simulado a 37 °C durante 14 días. Se observaron capas delgadas, en forma de hojuelas en todas las muestras, además de crecimiento de apatita. Sin embargo, la muestra de pH 8 presentó una mayor cantidad de capas, lo que se atribuyó a una buena respuesta de bioactividad.

F. Castro, et al. (2013) sintetizaron hidroxiapatita (HA) a través de un micro-reactor tubular asistido con ultrasonido, donde se llevaron a cabo estudios con SPF single phase fluid, por sus siglas en inglés, y GLF, gas-liquid fluid, por sus siglas en inglés. Observando mejoras en las características en las apatitas sinterizadas en estos sistemas, que con la apatitas comerciales.

El micro-reactor tubular sumergido en un baño de ultrasonido, trabajó a flujo continuo mezclando solución de hidróxido de calcio con ácido ortofosfórico para dar lugar a la precipitación de la hidroxiapatita (HA). La configuración SPF era tipo "T" para mezclar las dos sales precursoras de la HA y la configuración GLF era tipo "X" para permitir la entrada de gas nitrógeno y tener una configuración alternada de nitrógeno-disolución-nitrógeno-disolución. Esta última con el objetivo de propiciar una buena mezcla y reducir los tamaños de partícula. El baño de ultrasonido se utilizó a una frecuencia de 40 kHz.

De acuerdo a los difracción de rayos X, de forma general todas las muestras presentaron la fase de hidroxiapatita, exceptuando 2 muestras (GLF) que presentaron fosfato tricálcico  $\beta$ -TCP y fosfato dicálcico dihidratado (DCPD). Los patrones de difracción obtenidos, no mostraron correlación con los tiempos de residencia durante la reacción. Referente a los espectros de FT-IR, las bandas presentes en todas las muestras era las características de una

apatita tipo B, donde los grupos carbonatos sustituyen a los fosfatos. De acuerdo a la morfología de las muestras preparadas con la configuración GLP mostraron tamaños de partículas más pequeños y se redujo la formación de agregados en comparación con las muestras por SPL. Lo anterior puede ser debido a que el gas nitrógeno forma secciones pequeñas de reacción promoviendo el mezclado y homogeneidad, dando lugar a la formación de partículas pequeñas y uniformes. Cabe resaltar, que para ambas configuraciones los tamaños de partícula de las apatitas fueron nanométricos.

M. Mohebali, et al. (2011) sintetizaron nanopartículas de hidroxiapatita con una morfología de agujas, utilizando como sales precursoras hidróxido de calcio y ácido fosfórico, para prevenir pasos intermedios en la eliminación de iones no correspondientes a la apatita. Las disoluciones de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y  $\text{H}_3\text{PO}_4$  se mezclaron y agitaron con ultrasonido de 18 W. De acuerdo a los difracción de rayos X las partículas que se formaron fueron de tamaños nanométricos y poco cristalinas. En microscopía de barrido se observaron morfologías de agujas y formación de agregados.

M. de Campos F. A., et al. (2007) sintetizaron nanopartículas de fosfatos de calcio hidroxiapatita /  $\beta$ -TCP por precipitación con sonicación a 50 kHz. De acuerdo a los resultados obtenidos por difracción de rayos X, la bifase del fosfato de calcio (BCP) se obtuvo por arriba de 600 °C. Logrando obtener una superficie específica de 100  $\text{m}^2/\text{g}$  y con tamaño de partícula de 50 nm.

W. Kim, et al. (2001) estudiaron los efectos del sonicador a diferentes tiempos en la preparación de hidroxiapatita utilizando como sales precursoras  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Con el objetivo, de proporcionar información acerca de las condiciones requeridas para obtener la monofase de hidroxiapatita, utilizando las sales precursoras antes mencionadas con radiación de ultrasonido.

Con difracción de rayos X se observó que la muestra sonicada por 5 minutos presentó 3 fases: fosfato dicálcico hidratado (DCPD), hidroxiapatita (HAp) y carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Después de 30 minutos de sonicación, los picos correspondientes a las fases DCPD y  $\text{CaCO}_3$  se reducen de manera significativa, y estos mismos después de 60 minutos de sonicación prácticamente desaparecen, dejando solo a la fase HAp. No se observaron cambios en la fase obtenida a los 120 minutos y a 60 minutos. Indicando que la síntesis para obtener la fase HAp se ha completado a los 60 minutos de sonicación. Se observó un incremento de la superficie específica cuando al alcanzar los 15 minutos de sonicación, por arriba de 70  $\text{m}^2/\text{g}$  y el tamaño promedio de partícula fue de 2  $\mu\text{m}$ .

D. Gopi K. M., et al. (2008) sintetizaron polvos de hidroxiapatita por método sol-gel asistida por ultrasonido. Posteriormente, los polvos se sometieron a calentamiento. De manera paralela, se sintetizaron polvos de hidroxiapatita, de forma similar a lo anterior pero sin ultrasonido. De acuerdo a la difracción de rayos X, las muestras asistidas con ultrasonido no mostraron trazas de impurezas. Mientras que los polvos obtenidos sin agitación por ultrasonido, presentaron fases secundarias. Con las micrografías de barrido, los polvos asistidos con ultrasonido presentaron tamaños nanométricos 35-80 nm, y de manera contraria, los polvos sin ultrasonido presentaron un tamaño de entre 120-200 nm. Por lo anterior, lograron obtener tamaños de partícula nanométrico por sol-gel asistido con ultrasonido.

M. Sdat-Shojai, et al. (2013) realizaron una revisión sobre los métodos de preparación para obtener nanopartículas de hidroxiapatita, mostrando las ventajas y desventajas en cada proceso de síntesis. Ellos clasifican los métodos de preparación en cinco grupos: método seco (con dos subgrupos); método húmedo (con 6 subgrupos); procesos a altas temperaturas (con dos subgrupos); método de síntesis basado en recursos naturales; y métodos combinados. A continuación en la Tabla 1, se muestran las condiciones de trabajo para cada proceso de síntesis.

Tabla 1. Comparación de distintos mecanismos de síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita (M. Sdat-Shojai 2013).

Método		Aspectos de procesamiento		Características del Polvo				
		Cantidad de reactivos	<sup>2</sup> Costo	Morfología	Grado de Cristalinidad	Pureza de la Fase	Relación Ca/P	Tamaño
Método seco	Estado sólido	≥ 2	Bajo (\$11/g)	Diversa (esferas, tiras, prisma)	Muy alto	Usualmente bajo	Variable	Usualmente micras
	Mecanoquímico	≥ 2	Bajo (\$11/g)	Diversa (esferas, tubo)	Muy alto	Bajo	Usualmente no estequiométrico	Nano
Método húmedo	Precipitación química	≥ 2	Bajo (\$3/g+6.6/mL)	Diversa (esfera, hojuela, agujas)	Frecuentemente bajo	Variable	No estequiométrico	Usualmente nano
	Hidrólisis	≥ 3	Usualmente alto (\$30/g)	Diversa (hojuela, fibra, nanotubo)	Variable	Usualmente alto	Estequiométrico	Variable
	Sol-gel	≥ 3	Variable (\$21.24/g)	Diversa (micro y nano esferas, aguja)	Variable (usualmente bajo)	Variable	Estequiométrico	Nano
	Hidrotérmico	≥3	Usualmente alto (\$93/g)	Frecuentemente forma de aguja	Muy alto	Usualmente alto	Estequiométrico	Nano o Micras
	Emulsión	≥3	Alto (\$80/g)	Frecuentemente forma de aguja	Frecuentemente bajo	Variable	No estequiométrico	Nano
	Sonoquímico	≥2	Bajo (\$3/g+6.6/mL)	usualmente forma de aguja	Variable	Usualmente alto	Variable	Nano
Métodos a altas temperaturas	Combustión	≥3	Usualmente bajo (\$12/g)	Diversa (usualmente irregular)	Variable	Usualmente alto	Variable	Usualmente nano
	Pirolisis	≥3	Usualmente Bajo (\$15/g)	Diversa	Alto	Variable	Usualmente estequiométrico	Nano partículas
Síntesis con recursos naturales		≥3	Usualmente bajo	Diversa (esferas, nanotubos, láminas)	Variable	Usualmente alto	Variable	Variable
Procesos combinados		≥3	Variable	frecuentemente forma de aguja	Frecuentemente alto	Usualmente alto	Usualmente estequiométrico	Usualmente nano

<sup>2</sup> Costo (M.N.) aproximado de reactivos por cada gramo de éstos utilizado en la reacción.

En la Tabla 1 se puede observar las diferentes características que puede adquirir la hidroxiapatita dependiendo del proceso de síntesis. También se pueden comparar los costos de síntesis entre cada método.

-La síntesis del estado-sólido, es un proceso sencillo, ya que las sales precursoras se muelen y se calcinan temperaturas tan altas como 1000 °C, y dependiendo las temperaturas de calcinación es el grado de cristalinidad de los polvos. Este proceso tiene como desventaja, la heterogeneidad en la composición de la fase, debido a la poca difusión de iones entre la fase sólida. La morfología de las partículas es irregular, lo que lo hace un método de síntesis poco atractivo.

-El proceso de síntesis mecanoquímico es un mecanismo de síntesis sencillo, donde las materias primas se muelen en un molino. Las partículas obtenidas tienen estructura definida. Además de ser sencillo y reproducible, se produce en masa y su microestructura es aceptable.

-El método húmedo, ha sido utilizado en la preparación de partículas de hidroxiapatita con estructura nanométrica y morfología regular, además de utilizarse, para entender el proceso de biomineralización *in vivo*. Los procesos de síntesis de métodos húmedos, suelen ser sencillos y las condiciones de crecimiento se controlan ajustando los parámetros de la reacción. Una de las desventajas, son las bajas temperaturas de preparación, lo que resulta en la generación de fases de CaP y/o disminución en la cristalinidad del polvo.

-El método de precipitación química es uno de los métodos más sencillos para sintetizar nano partículas de hidroxiapatita. De forma general los reactivos utilizados con hidróxido de sodio y ácido fosfórico, donde un reactivo se deja caer por goteo en el otro con agitación continua, y como último paso se deja en envejecimiento a presión atmosférica.

-La formación de hidroxiapatita por el método de hidrólisis, se lleva a cabo mediante la disolución y precipitación de fases de CaP. Este proceso de síntesis tiene menos estabilidad termodinámica con valores de pH por arriba de 6-7. Por lo anterior, la transformación de la fase es dependiente del pH.

-Con el método sol-gel, se logra una buena homogeneidad de los reactivos propiciando la síntesis de un polvo más homogéneo. Asimismo, el polvo obtenido usualmente es estequiométrico y con alta superficie específica. Una de las grandes desventajas, es la formación de fases secundarias y los altos costos de producción.

-En el método hidrotermal, donde las reacciones químicas se llevan a cabo en disolución acuosa y a elevada temperatura y presión, muestra que con éste método, se obtienen nano partículas de hidroxiapatita estequiométricas, que presentan alta grado de cristalinidad.

Sin embargo, las altas temperaturas y presiones utilizadas durante la síntesis producen costos elevados en comparación con otros métodos.

-El método emulsión, ha sido de gran interés no solo por la formación de polvos libres de aglomerados, sino también para controlar la microestructura y morfología de las partículas resultantes. Asimismo, la facilidad para sintetizar y las bajas temperaturas de síntesis, la hacen una técnica apropiada y atractiva para la producción de nano partículas de hidroxiapatita. Sin embargo, no deja de ser una técnica de altos costos.

-El método sonoquímico, se basa en la activación de la reacción química a través de la radiación por ultrasonido. Con esta técnica, se obtienen nano partículas y disminuye la presencia de aglomerados. El tiempo de sonicación es un factor importante en la formación de la fase cristalina de las nanopartículas.

-Los procesos a altas temperaturas, pueden llevarse a cabo por dos mecanismos: combustión o pirolisis. La característica clave de estas técnicas es la capacidad para producir en un solo paso la fase. Además de que los reactivos no son costosos, el proceso de preparación es simple y la homogeneidad de los reactivos es buena.

-El proceso por pirolisis, permite la producción de monocristales de hidroxiapatita estequiométrica, en donde los procesos involucrados deben ser estrictamente controlados. Requiere de tiempos largos de envejecimiento y elevadas temperaturas para alcanzar una alta cristalinidad en el producto.

-La síntesis a partir de fuentes naturales, es la preparación de materiales cerámicos de hidroxiapatita a partir de recursos naturales (materiales provenientes de organismos vivos). Como una de las desventajas, se puede mencionar el pre-tratamiento para remover la parte orgánica de la inorgánica y dar lugar con la obtención del producto de interés.

Finalmente tenemos la combinación de los procesos de síntesis para crear una estrategia de sinergia con el propósito mejorar las propiedades físico químicas del material.

N. Vargas Becerril, et al. (2013) prepararon un híbrido de hidroxiapatita con alendronato. Los polvos de apatita fueron sintetizados por el método de co-precipitación asistido por agitación magnética y agitación de ultrasonido. Los reactivos utilizados fueron hidróxido de calcio  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y ácido fosfórico  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , este último se agregó gota a gota en el hidróxido de calcio. De manera paralela el proceso de agitación por ultrasonido y agitación mecánica tuvieron una duración de 20 y 0.5 horas respectivamente. Los polvos se lavaron con agua destilada y posteriormente se dejaron secar a 100 °C. La agitación por ultrasonido se llevó a cabo a una frecuencia de 30 Hz.

Las apatitas se caracterizaron por difracción de rayos X, espectroscopia infrarroja (FT-IR), superficie específica y microscopía electrónica de barrido (MEB). Los resultados obtenidos por espectroscopia FT-IR, corresponden a las bandas características de la hidroxiapatita. Con difracción de rayos X se corroboró la fase de hidroxiapatita, el tamaño de cristal en los parámetros a y c fue de 12.34 y 18.65 nm respectivamente, correspondientes a la muestra sintetizada por agitación magnética. Los polvos agitados con ultrasonido se obtuvo un tamaño de cristal con parámetros a y c de 11.26 y 16.86 nm, respectivamente. En las micrografías, la morfología alargada correspondió a la muestra obtenida por agitación de ultrasonido y la muestra sintetizada con agitación magnética presento partículas redondeadas. La superficie específica, fue de 72 y 60 m<sup>2</sup>/g por agitación magnética y ultrasonido respectivamente. Por lo antes mencionado, el ultrasonido es una buena herramienta para sintetizar la fase de hidroxiapatita en tiempos cortos y obtener tamaños de partícula nanométricas.

D. Gopi J. I., et al. (2012), estudiaron los efectos de los tiempos de irradiación con ultrasonido en la cristalinidad y tamaño de las partículas de hidroxiapatita nanométrica. Los patrones de difracción indican que las muestras corresponden a la fase de hidroxiapatita. Además, se observó una disminución en el tamaño de partículas conforme aumentó la intensidad de irradiación con ultrasonido. En las micrografías de barrido, se observaron tamaños de partícula nanométricas entre 85 y 127 nm, con formación de aglomerados pero con distribución de tamaños uniformes. Por lo anterior, la irradiación con ultrasonido ayuda a regular los tamaños de partículas y el grado de cristalinidad. Los materiales obtenidos por esta técnica, pueden servir como biomateriales para diferentes aplicaciones biomédicas.

M. A. Giardina, et al. (2010) estudiaron el efecto del ultrasonido con respecto al tiempo de síntesis de la hidroxiapatita, y compararon los polvos obtenidos por síntesis de precipitación, utilizando ultrasonido y agitación mecánica.

De acuerdo a la difracción de rayos X, las muestras agitadas mecánicamente formaron dos fases hidroxiapatita y Ca(OH)<sub>2</sub>. Mientras que las muestras sintetizadas con agitación de ultrasonido presentaron una sola fase, correspondiente a la hidroxiapatita. Por lo anterior, A. Mariana y colaboradores sugieren que la radiación por ultrasonido es efectiva para obtener la fase de hidroxiapatita, siempre y cuando el precipitado se deje envejecer durante 24 horas. Además, uno de los factores importantes para lograr la precipitación directa de la hidroxiapatita depende de la disponibilidad de los iones PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, Ca<sup>2+</sup> y OH<sup>-</sup> en la disolución, siendo el mecanismo de agitación un factor clave para facilitar el proceso de disolución de los sólidos. El área específica de los polvos sintetizados, varió entre 20-70 m<sup>2</sup>/g. De acuerdo a las micrografías de barrido, las muestras sintetizadas con ultrasonido presentaron tamaños de partícula más pequeños en comparación a las sintetizadas por agitación magnética. Por lo anterior, es posible controlar el tamaño de cristal con el método de co-

precipitación asistido con ultrasonido, favoreciendo la obtención de la monofase hidroxiapatita.

V. Dhand K. Y.-J., et al. (2014) sintetizaron nanopartículas de hidroxiapatita por el método húmedo. Como ventajas de este método listan: alto rendimiento, bajos consumos energéticos, bajas temperaturas de síntesis, control del tamaño de partículas, y mezclado homogéneo. La síntesis se llevó a cabo a una temperatura por debajo de los 37 °C y con agitación magnética, dejando envejecer durante 24 horas.

De acuerdo a difracción de rayos X, la fase obtenida fue de hidroxiapatita, con tamaño de cristal entre 15-60 nm  $\pm$  5 nm, acorde con los resultados obtenidos con microscopía de barrido y de transmisión. Además, en las micrografías de barrido, las partículas presentaron un crecimiento alargado entre 200 y 500 nm. De acuerdo a los resultados obtenidos, se lograron sintetizar nanotubos de hidroxiapatita, los cuales pueden ser potencialmente útiles en el área biomédica.

Z. Zou, et al. (2012) sintetizaron nano polvos de hidroxiapatita carbonatada vía sonocímica asistida por microondas, estudiando la influencia de las microondas e irradiación por ultrasonido en la cristalinidad, morfología, relación molar Ca/P, superficie específica y rendimiento. El ultrasonido, se programó a una frecuencia y potencia de 25 kHz y 900 W, durante 5 minutos. También se sintetizó hidroxiapatita por el método de precipitación convencional y se compararon los resultados con la síntesis anterior. Con respecto al análisis elemental, las muestras sintetizadas por precipitación convencional y utilizando agitación con ultrasonido, mostraron valores no cercanos al estequiométrico Ca/P = 1.67. Mientras que las muestras sintetizadas con microondas y asistida con ultrasonido presentó valores muy cercanos al 1.67. Por otro lado, con difracción de rayos X se observó que todos los polvos corresponden a la fase hidroxiapatita. Con respecto al grado de cristalinidad, se observó un incremento en las muestras sintetizadas con microondas y ultrasonido en comparación con el proceso convencional asistido con ultrasonido. En las micrografías de barrido, las muestras por síntesis convencional presentaron muchos aglomerados mientras que los polvos por microondas y ultrasonido, tenían forma de nanotubo y no se observaban aglomerados. Por último, los polvos sintetizados por ultrasonido y microondas, presentaron mayor superficie específica 93.1 y 89.2 m<sup>2</sup>/g. En contraste, las muestras con síntesis convencional presentaron aglomerados y superficie específica de 43.7 m<sup>2</sup>/g, menor que las anteriores. Por lo antes mencionado, el método de microondas asistido con ultrasonido, fue rápido, efectivo y sencillo, en la obtención de nanopartículas de hidroxiapatita altamente cristalinas y con una relación Ca/P muy cercana al valor teórico 1.67.

## Capítulo II. Materiales y Métodos

### 2.1 Síntesis de hidroxiapatitas: HAb, HAm y HAs

Para lograr la síntesis de hidroxiapatita [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] en este estudio, se llevó a cabo el método de síntesis húmedo por co-precipitación. Se realizaron tres síntesis con tres mecanismos de agitación diferentes para cada uno, como se muestra en la 0.

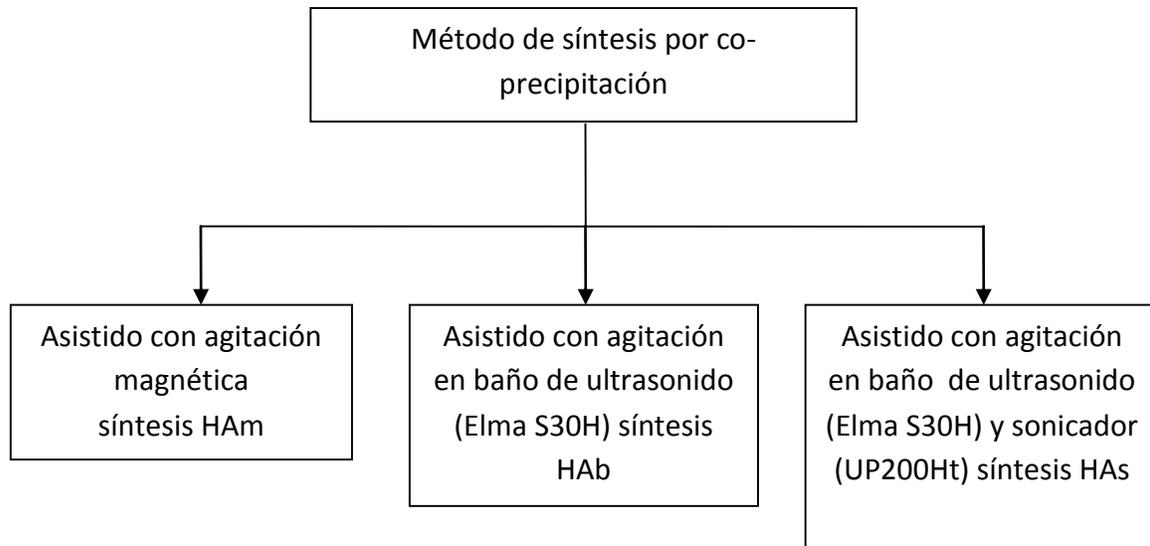


Figura 3. Esquema con los distintos mecanismos de agitación

### 2.2 Materiales y Reactivos

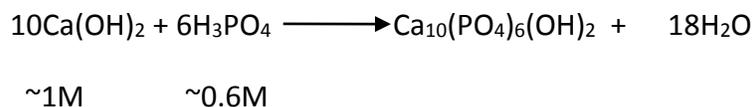
Las características de los reactivos precursores para la síntesis de Hidroxiapatita, se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. <sup>3</sup>Reactivos utilizados para la síntesis

Reactivos	Pureza (%)	Marca comercial
H <sub>2</sub> O tridestilada	99	Sigma-Aldrich (CAS 7732-18-5)
Ca(OH) <sub>2</sub>	95	Sigma-Aldrich (CAS 1305-62-0)
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	85.7	J. T. Baker (CAS 7664-38-2)

<sup>3</sup> Las impurezas presentes en el H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> son Calcio, Magnesio e Hidróxido de amonio. En el hidróxido de Calcio las impurezas son carbonatos de calcio. Y en el agua desionizada se encuentran trazas de inorgánicos.

La síntesis de los materiales se llevó a cabo en una etapa, utilizando como sales precursoras disolventes de hidróxido de calcio  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y ácido fosfórico  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ; el esquema de reacción se presenta a continuación.



De acuerdo a la estequiometría de la reacción antes mostrada, se realizó una base de cálculo para obtener aproximadamente 20 g de hidroxiapatita (HA). Así, se prepararon 2 disoluciones, para la disolución 1, se adicionaron 14.75 g de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  en un matraz con 200 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada. En la disolución 2, se diluyeron 8 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  en 235 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada. Las disoluciones 1 y 2 fueron las sales precursoras para sintetizar la HA en los tres procesos de síntesis HAm, HAb y HAs asistidos por las agitaciones magnética (200 rpm), baño de ultrasonido (50 Hz) y baño de ultrasonido con sonicador de alta frecuencia (27 kHz), respectivamente. La disolución 2 se añadió por goteo, a través de una bureta, en la disolución 1. Las síntesis se realizaron a temperatura ambiente y con agitación continua. Este último parámetro, como es natural, se realizó de forma distinta entre cada una de las síntesis, debido a las diferencias en el arreglo experimental.

En la síntesis HAm, la agitación se llevó a cabo con parrilla de agitación magnética, donde en todo el proceso de síntesis, se mantuvo en agitación la disolución 1, mientras se goteaba la disolución 2. En la síntesis HAb, se utilizó un baño de ultrasonido (Elma S30H), que al igual que la síntesis de la muestra HAm, la agitación fue constante durante todo el proceso. Por último la síntesis HAs, se realizó con agitación con baño de ultrasonido (Elma S30H) y un sonicador de punta ultrasónica (UP200Ht), en ésta última síntesis, se mantuvo constante la agitación con el baño de ultrasonido en la disolución 1, mientras que el sonicador de punta ultrasónica (UP200Ht) se empleó para agitar la disolución 1, en intervalos de tiempo de 5 segundos hasta alcanzar el pH deseado. El control del pH, también se realizó para las muestra HAm y HAb, se agitaron hasta obtener un pH entre 8.5 y 9.0.

Posteriormente, las muestra HAm, HAb y HAs se dejaron en agitación durante 24 horas, 30 minutos y 15 minutos, respectivamente. Después de completar los tiempos de agitación, las muestras se filtraron y finalmente se dejaron secar en un horno a 100 °C, para posteriormente triturar las muestras con ayuda de un mortero. A continuación, se muestra en la Figura 4, un esquema general de las tres síntesis realizadas para la obtención de Hidroxiapatita.

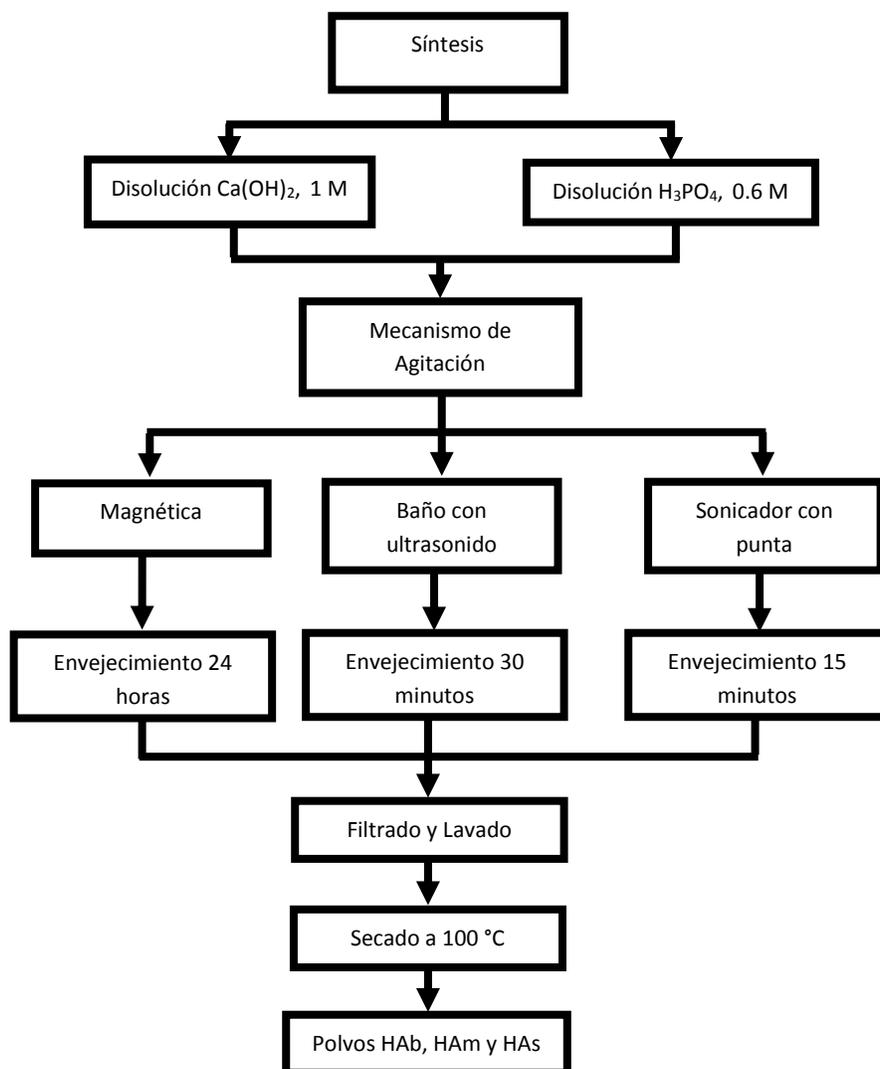


Figura 4. Esquema de síntesis para las muestras HAb, HAm y HAS

## 2.3 Caracterización estructural, microestructural y química

### 2.3.1 Espectroscopia infrarroja-trasformada de Fourier (FT-IR)

Espectroscopia infrarroja, se realizó para determinación y análisis de grupos funcionales, característicos de las hidroxiapatitas sintetizadas (HAb, HAm y HAS); se utilizó el equipo NICOLET NEXUS 670 FT-IR. La proporción de muestra (HAb, HAm y HAS) y bromuro de potasio para preparar las pastillas fue de 1:100. Además, las muestras se analizaron en la

zona de espectro infrarrojo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando 32 escaneos y con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### **2.3.2 Espectroscopia Raman (Raman)**

Como técnica complementaria al FT-IR, se utilizó la técnica de espectroscópica de micro Raman, donde se identificaron grupos funcionales de las muestras HAb, HAm y HAs. El equipo utilizado fue el Nicolet Almega XR Diversie Raman, con un láser de 532 nm al 100 %, y objetivo X100 en el microscopio. En cuanto a la preparación de las muestras, se colocó aproximadamente 0.01 g de polvo de cada muestra en su respectivo porta objetos, para posteriormente proceder a enfocar con el microscopio óptico y obtener el espectro de cada muestra.

### **2.3.3 Análisis termogravimétrico (TGA)**

Esta técnica de análisis térmico se utilizó para estudiar la descomposición de los materiales (HAb, HAm y HAs) y determinar la presencia de compuestos en los materiales como carbonatos, agua superficial y estructural. El estudio se realizó con el equipo TGA Q500 v3.15. El calentamiento de las muestras se llevó de temperatura ambiente a 1000 °C a una razón de calentamiento de 20 °C / min en una atmósfera de nitrógeno, y aproximadamente se utilizaron 4.8 mg de cada muestra para realizar el análisis.

### **2.3.4 Difracción de Difracción de rayos X (DRX)**

La técnica DRX, se utilizó para identificar la fases en los materiales (HAb, HAm y HAs). Dicho análisis, se realizó con un equipo Bruker Advance D8, con una fuente de difracción de rayos X de cobre a 40 kV, y una intensidad 35 mA. Las muestras se analizaron con las siguientes condiciones: incrementos 0.02 grado, velocidad de barrido 1 segundos por punto y en un intervalo ángulo  $2\theta$  de 4° a 130°.

### **2.3.5 Refinamiento por método de Rietveld**

Para analizar los parámetros estructurales existentes en las muestras (HAb, HAm y HAs), se utilizó el método de refinamiento Rietveld. Para ello, se utilizó el programa TOPAS 3, para obtener información acerca de la estructura cristalina. Se refinó el factor de escalamiento, para colocar en la misma escala a los difractogramas, experimental y teórico. Asimismo los parámetros de red en la celda y el fondo se refinaron. El grupo espacial  $P6_3/m$  con parámetros de red  $a = 0.94166 \text{ nm}$  y  $c = 0.68745 \text{ nm}$  (J. M. Hughes 1989).

### **2.3.6 Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

La caracterización morfológica de los materiales, (HAb, HAm y HAS) se realizó utilizando la técnica de microscopía MEB. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido (MEBEC) JEOL-6701F. Se utilizó un voltaje de 5 kV y una distancia de trabajo de 11 mm.

### **2.3.7 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Para la caracterización microestructural en las muestras HAb, HAm y HAS se prepararon sobre rejillas de cobre recubiertas con colodion y una capa fina de carbón. El equipo utilizado fue JEOL 4000 EX operado a 400 KV.

### **2.3.8 Área superficial específica Brunauer-Emmett-Teller (BET)**

Esta prueba de caracterización se realizó para determinar la superficie específica de los materiales (HAb, HAm y HAS) mediante el método BET. La temperatura de desgasificación fue de 100 °C durante 90 minutos.

### **2.3.9 Análisis elemental de plasma óptico (ICP-OES)**

El análisis elemental se realizó para cuantificar el calcio y fósforo presentes en los materiales, y de esta manera, determinar la relación Ca / P en cada material. El análisis se llevó a cabo con un plasma óptico acoplado inductivamente (Optical Emission Spectrometer Optima 4300 DV). La curva de calibración para Ca y P se preparó a partir de 2 estándares de calibración de 1000 ppm cada una. La digestión se llevó a cabo en vía húmeda.

## **2.4 Respuesta de biocompatibilidad**

A continuación se describen los pasos que se siguieron para realizar las pruebas de biocompatibilidad. Posterior a la realización de las secciones (2.4.3) y (2.4.4) se llevó el análisis estadístico ANOVA (2.4.5).

#### **2.4.1 Preparación de andamios para las muestras: HAb, HAm y HAs**

Los polvos de hidroxiapatita se prepararon con una pastilladora de discos. Se colocaron 0.1g de cada una de las muestras HAb, HAm y HAs por separado en la pastilladora; aplicándose una presión de 1 tonelada durante 3 minutos para obtener una pastilla muy fina. Estas pastillas en forma de disco, se esterilizaron para realizar los cultivos celulares, por medio de incubación en una disolución de 75% de etanol con 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina) durante 30 minutos. Pasado este tiempo, las biocerámicas se dejaron secar en una campana de flujo laminar con UV durante 30 minutos previo a las pruebas biológicas.

#### **2.4.2 Cultivo celular**

La línea celular referente a las células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSc) fueron donadas por el Dr. Juan José Montesinos Montesinos de la Unidad de Investigación de Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Dicha línea celular, fue utilizada para caracterizar la biocompatibilidad y la bioactividad sobre las biocerámicas (HAb, HAm, HAs). Las células BM-MSc, se mantuvieron en medio de cultivo alfa-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una disolución de antibióticos (penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y fungisona (0.3 µg/ml), 2 mM de glutamina y 50 mM de aminoácidos no esenciales. Para la propuesta experimental, se utilizaron cultivos celulares del segundo y quinto pasaje. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37 °C y en una atmósfera de 95 % de aire y 5 % de CO<sub>2</sub> en un ambiente con 100 % de humedad.

#### **2.4.3 Ensayo de proliferación celular / viabilidad**

Para determinar la influencia que presentan las biocerámicas (HAb, HAm, HAs) sobre la proliferación celular, se utilizó el kit PrestoBlue Cell Viability Reagent (Life Technologies). El presto blue, es una disolución basada en una sal de resazurina, que funciona como un indicador de la viabilidad celular, y que utiliza el poder reductor de las enzimas deshidrogenasas tanto mitocondrial como citosólicas de las células vivas para medir cuantitativamente la proliferación de las células. El reactivo PrestoBlue, contiene un compuesto que es permeable a las membranas de color azul y virtualmente, no es fluorescente. Cuando se añade a las células, el reactivo es modificado por el ambiente reductor de las células viables, y se vuelve de color rojo y se convierte en altamente fluorescente. Este cambio se puede detectar usando mediciones de fluorescencia o absorbancia a 570 y 600 nm. Para nuestro estudio de viabilidad/proliferación, las células

BM-MSC fueron sembradas a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/mL por triplicado en las distintas biocerámicas durante 3, 5, 7, 14 y 21 días de cultivo celular. Después de cada periodo experimental, las células fueron incubadas con 50  $\mu$ L de la disolución de PrestoBlue a 37 °C durante 4 horas. Pasado este tiempo, se tomó del sobrenadante 200  $\mu$ L y se depositaron en una placa de 96 pozos para ser llevado a lectura en un espectrofotómetro de ELISA, para obtenerse la densidad óptica a una longitud de onda de excitación de 570 nm y de emisión de 600 nm. Debido a que la generación del producto es directamente proporcional a la actividad oxidativa de las enzimas deshidrogenasas, una disminución en los valores que se obtengan de la reducción del reactivo, nos indicaría una medida de la viabilidad celular sobre las biocerámicas.

#### **2.4.4 Fosfatasa alcalina**

Para determinar la bioactividad celular de las BM-MSC sobre las biocerámicas (HAb, HAm, HAs) se llevó a cabo el ensayo enzimático de la fosfatasa alcalina (ALP). La ALP es una enzima que cataliza la hidrólisis del enlace éster fosfórico entre un grupo orgánico y un grupo fosforilo a pH alcalino, lo que libera fosfato al medio. Esta enzima es responsable de la mineralización del tejido óseo, que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células madre mesenquimales hacia pre-osteoblastos y posteriormente dar lugar a la formación de osteoblastos. Para evaluar la presencia de la ALP las células BM-MSC, se sembraron sobre los andamios (HAb, HAm y HAs) a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/mL y por triplicado, en las distintas biocerámicas durante 3, 5, 7, 14 y 21 días de cultivo celular. Al término de cada periodo experimental de incubación, las células fueron lavadas con PBS y se sometieron a sonicación para extraer las capas celulares en una disolución amortiguadora con 10 mM de Tris-HCL pH 7.4 más 0.1% de tritón X-100, con la finalidad facilitar el desprendimiento de las células sobre los andamios (HAb, HAm y HAs). Posteriormente se transfirieron 50  $\mu$ L de cada muestra a un plato de cultivo de 96 pozos, adicionando 30  $\mu$ L de la disolución activadora de la enzima que lleva 2 mM de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) en una disolución amortiguadora con 10mM de tris-HCl pH 9.8, y enseguida se agregaron 50  $\mu$ L de la solución p-nitrofenilfosfato (pNPP) en cada pozo de las muestras a una concentración de 8 mM, y se incubaron a 37°C por 60 minutos para que la reacción enzimática se lleve a cabo. La reacción enzimática se detuvo adicionando 20  $\mu$ L de 0.05 N de hidróxido de sodio (NaOH), y se realizaron mediciones de la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm, para medir la cantidad de producto formado, p-Nitrofenol, compuesto que cambia a color amarillo en disolución alcalina.

### 2.4.5 Diseño estadístico

Todos los experimentos de los análisis de biocompatibilidad celular se realizaron por triplicado. Se compararon 3 distintas morfologías de las biocerámicas de hidroxiapatita: HAb, HAM y HAS, a diferentes tiempos (3, 5, 7, 14 y 21 días) contra el control positivo (CP 100%). La comparación se llevó a cabo con el análisis de varianza (ANOVA) multifactorial utilizando Excel. El diseño de experimentos implementado fue para 2 factores con 3 réplicas. Lo anterior con la finalidad de hacer un análisis entre factores y dentro de cada factor, y conocer las interacciones entre éstos. Los valores se consideraron estadísticamente significativos para una  $p < 0.05$ .

## Capítulo III. Resultados y Discusión

### 3.1 Espectroscopia Infrarroja

Los espectros obtenidos por la técnica espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier FT-IR, por sus siglas en inglés, que se muestran en la Figura 5, brindan información de la estructura química del enlace de las muestras de hidroxiapatita HAb, HAM y HAS, sintetizadas por el método de co-precipitación asistidas por mecanismos distintos de agitación.

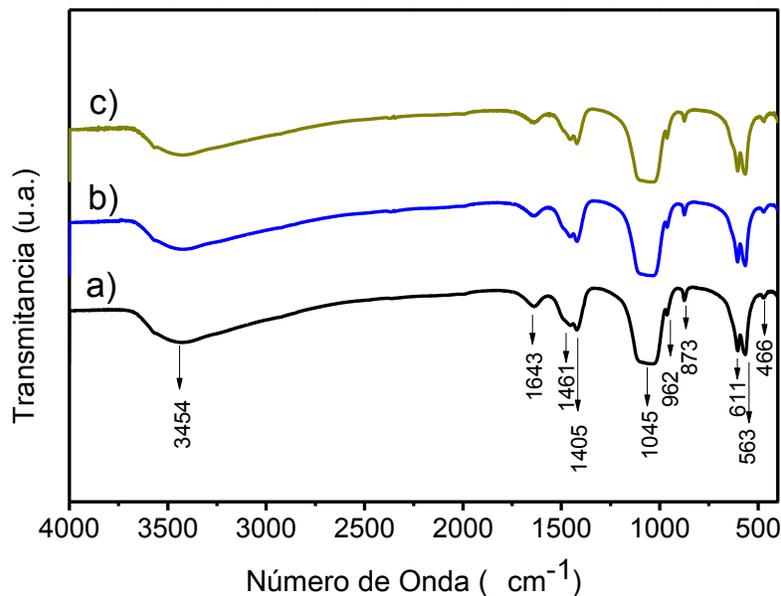


Figura 5. Espectros infrarrojos hidroxiapatita: a) HAb; b)HAM; c) HAS

Los espectros IR de los polvos de hidroxiapatita, presentan la banda de absorción a  $962\text{ cm}^{-1}$  que se asocia al modo de vibración  $\nu_1$  del grupo fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). La banda presente a  $1045\text{ cm}^{-1}$  corresponde al modo de vibración  $\nu_3$  de los fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Las bandas presentes a  $563$  y  $611\text{ cm}^{-1}$  se deben al modo de vibración  $\nu_2$  de los fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Los grupos carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) se observan a  $873$ ,  $1405$  y  $1461\text{ cm}^{-1}$ , que corresponden a los modos de vibración  $\nu_2$  y  $\nu_3$ , respectivamente. Por último las bandas presentes a  $1643$  y  $3454\text{ cm}^{-1}$  corresponden a los grupos hidroxilos ( $\text{OH}^-$ ) y agua (Y. D. Y. Sun 2013) (M.P. Mahabole 2005) (M. Sadat-Shojai 2009) (W. Bing Tien 2012) (A. Krajewski 2005).

Es bien sabido que la apatita carbonatada, se compone de iones carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) en sitios distintos; uno de ellos es la hidroxiapatita carbonatada Tipo A en la que los iones  $\text{CO}_3^{2-}$  sustituyen a los iones  $\text{OH}^-$  en la HA. Otro es el tipo B, en el que los iones  $\text{CO}_3^{2-}$  sustituyen a los iones  $\text{PO}_4^{3-}$ . De acuerdo a estudios realizados (J. M. Hughes 1989) (P. X. X. Guo 2006) (R. Astala 2005) (I. R. Gibson 2001), se sugiere que este tipo de sustituciones se deben a la temperatura de síntesis empleada. A altas temperaturas ( $900 - 1000\text{ }^\circ\text{C}$ ) los iones  $\text{CO}_3^{2-}$  ocupan los sitios de iones  $\text{OH}^-$  llamados Tipo A dando lugar a las bandas de absorción  $1539$ ,  $1419$  y  $873\text{ cm}^{-1}$  (M. Lafisco 2014). Por otro lado, en los materiales sintetizados a temperatura ambiente, donde los iones  $\text{CO}_3^{2-}$  sustituyen a los iones  $\text{PO}_4^{3-}$ , se denomina hidroxiapatita tipo B ( $1475$ ,  $1419$  y  $873\text{ cm}^{-1}$ ) (P. X. X. Guo 2006). De acuerdo a lo anterior, en los resultados de FT-IR muestran la fase sintetizada de hidroxiapatita carbonatada tipo B en todas las muestras HAb, HAm y HAs. El análisis FT-IR proporciona información acerca del tipo de sustitución carbonatada en los materiales de HA, y la presencia de las bandas  $873$ ,  $1405$  y  $1461\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a una sustitución de tipo B (J. M. Hughes 1989) (P. X. X. Guo 2006) (R. Astala 2005) (A. Krajewski 2005). Cabe destacar que la sustitución de iones que impulsa la formación de apatita biológica, por lo general es la sustitución Tipo B, relacionada con la sustitución de fosfatos por grupos carbonatos (M. Manda-Guiba 2014).

Con base en el análisis químico por FT-IR, no se observan diferencias entre los espectros que puedan ser atribuibles al mecanismo de agitación, por lo anterior, se sugiere que la técnica ha servido para identificar los grupos funcionales correspondientes a la hidroxiapatita.

### 3.2 Espectroscopia Raman

La caracterización con espectroscopia Raman, se realizó como técnica complementaria al análisis de espectroscopia infrarroja FT-IR, en la identificación de bandas asociadas a la hidroxiapatita. Como se muestra a continuación en la Tabla 3 y en la Figura 6.

Tabla 3. Asignación de bandas Raman para las muestras HAb, HAm y HAs

Bandas	Modos de Vibración	Número de Onda (cm <sup>-1</sup> ) HAb	Número de Onda (cm <sup>-1</sup> ) HAm	Número de Onda (cm <sup>-1</sup> ) HAs
1	v <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	418	411	410
2	v <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	569	571	571
3	v <sub>1</sub> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	943	945	947
4	v <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1053	1049	1045
5	OH <sup>-</sup>	3554	3556	3562

La Figura 6 presenta las bandas a 410-418, 569-571, 943-947 y 1045-1053 cm<sup>-1</sup> que corresponden a los grupos fosfatos, que son grupos funcionales características de hidroxiapatita. La banda que se localiza entre 3554-3562 cm<sup>-1</sup> se atribuye a los grupos hidroxilos OH<sup>-</sup>. En las bandas correspondientes a los grupos hidroxilos OH<sup>-</sup> y grupos fosfatos PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> de las muestras HAs, HAm y HAb, se presenta un comportamiento decreciente (HAs>HAm>HAb) correspondiente a las intensidades. Lo cual, se debe a una mayor incorporación de los iones carbonatos (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) en la red cristalina de las muestras HAb y HAm. Mientras que en la muestra HAs la disponibilidad de grupos fosfatos es mayor, en consecuencia la incorporación de los grupos carbonatos en la red cristalina es menor (M. Manda-Guiba 2014). Lo anterior puede deberse a la agitación con ultrasonido con punta (27 kHz), ya que ésta, propicia alta energía en una disolución por cavitación acústica. (Z. Zou 2012) (S. Inthong 2013) (M. Sadat-Shojai 2009) (W. Bing Tien 2012). Además, el tiempo de envejecimiento favorece la sustitución de los grupos carbonatos dentro de la red cristalina de la hidroxiapatita (A. Krajewski 2005) (K. Y.-J. V. Dhand 2014) (M. Iafisco 2014) (D. G. A. Nelson 1982).

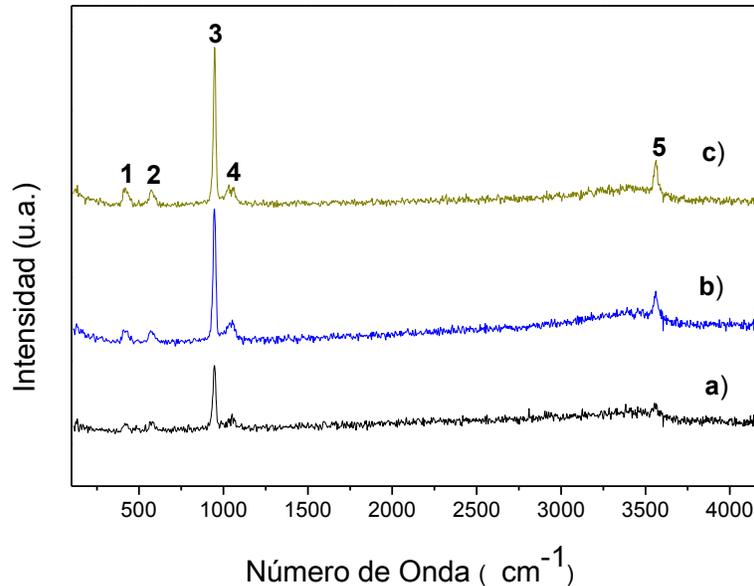


Figura 6. Espectroscopia Raman de la hidroxiapatita: a) HAb; b) HAm; c) HAs

Las ondas de alta frecuencia producidas la punta de ultrasonido, utilizado como mecanismo de agitación en la muestra HAs, acelera el proceso de reacción favoreciendo la nucleación y crecimiento del cristal con una disposición de empaquetamiento hexagonal, de manera que, conforme la reacción progresa, la estructura hexagonal crece por interacción de los iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{OH}^-$ . Durante este periodo, el crecimiento del cristal es axial a través del apilamiento de capas hasta alcanzar la saturación, lo que permite la maduración de Ostwald y finalmente da lugar al rompimiento del cristal. Este ciclo se repite hasta que las partículas más grandes, han sido utilizadas para el crecimiento de los cristales (K. R.-J. V. Dhand 2014). Asimismo, el tiempo de envejecimiento propicia el crecimiento del cristal a lo largo del parámetro “c”, donde se localizan los grupos hidroxilos de la estructura cristalina en la hidroxiapatita (K. Y.-J. V. Dhand 2014) (D. G. A. Nelson 1982).

### 3.3 Análisis Termogravimétrico

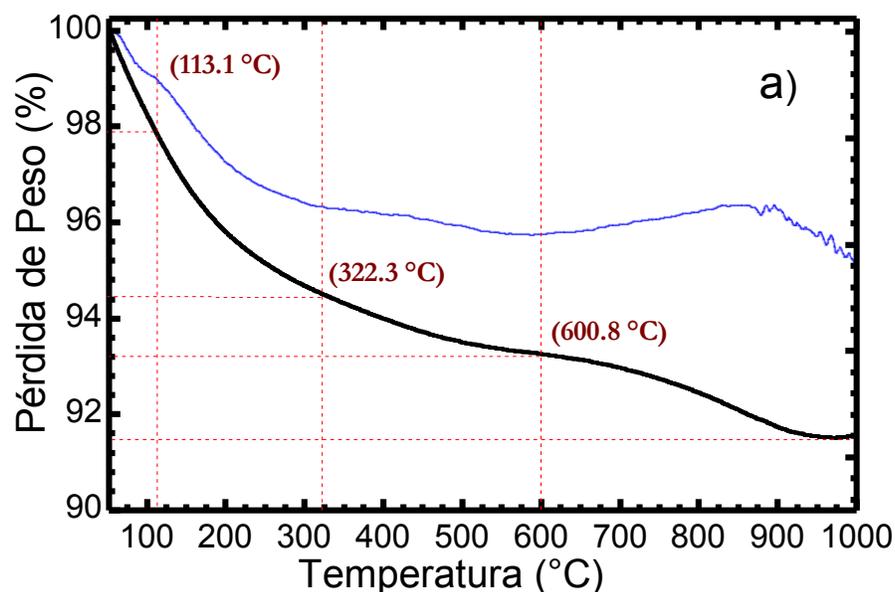
En los termogramas (TG color negro) de la Figura 7, se muestran 4 etapas de descomposición de los materiales sintetizados por co-precipitación HAb, HAm y HAs. Las cuales se delimitaron con ayuda de la derivada de las curvas TG (color azul) correspondientes a cada muestra.

Las curvas de TG de la Figura 7, presentaron una primera pérdida de peso cerca de los 130 °C asociada al agua adsorbida. Siento la muestra HAb, la de mayor pérdida en peso con respecto a las muestras HAm y HAs, (Tabla 4). Lo anterior se atribuye a su superficie

específica, debido a que, es casi 2 veces mayor que las muestras HAm y HAs, lo que promueve su interacción de éste con el medio circundante. En la segunda etapa cercana a 322.3 °C, 339.6 °C y 402.2 °C, se observó la pérdida de agua estructural en las muestras HAb, HAm y HAs, respectivamente. Asimismo se detectó un ligero aumento a 600.8 °C (HAb), 681.3 °C (HAm) y 763 °C (HAs) en la pérdida de peso asociado al agua liberada debido a la reacción  $2HPO_4^{-2} \rightarrow P_2O_7^{-4} + H_2O$  (Z. Z. Zyman 2009). Cabe destacar, que la muestra HAs tuvo menos pérdida (Tabla 4), lo que se asocia a la reacción de los iones fosfatos, por efecto del sonicador con punta, para formar parte de la estructura de la HA. Ésta pérdida por efecto de fosfatos ácidos ( $HPO_4^{-2}$ ) correlaciona con las bandas identificadas en IR, cercanas a  $1100\text{ cm}^{-1}$ . Por último, la pérdida por arriba de 650 – 700 °C se asocia a la descomposición de carbonatos ( $CO_3^{-2}$ ), donde se cuantificó la mayor pérdida de peso en la muestra HAb. Lo que está en conformidad con lo observado, y antes explicado por espectroscopia Raman. Y para finalizar, se registró una pérdida de peso total en las muestras HAb (8.50 %), HAm (7.68 %) y HAs (6.79 %) (K. Y.-J. V. Dhand 2014) (P. X. X. Guo 2006) (R. Murugan 2006).

Tabla 4. Análisis Térmico

	H <sub>2</sub> O adsorbida (% en peso)	H <sub>2</sub> O estructural (% en peso)	H <sub>2</sub> O debido HPO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> (% en peso)	CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup> (% en peso)
HAb	2.10	3.40	1.26	1.74
HAm	1.74	3.21	1.10	1.63
HAs	1.50	3.13	0.94	1.22



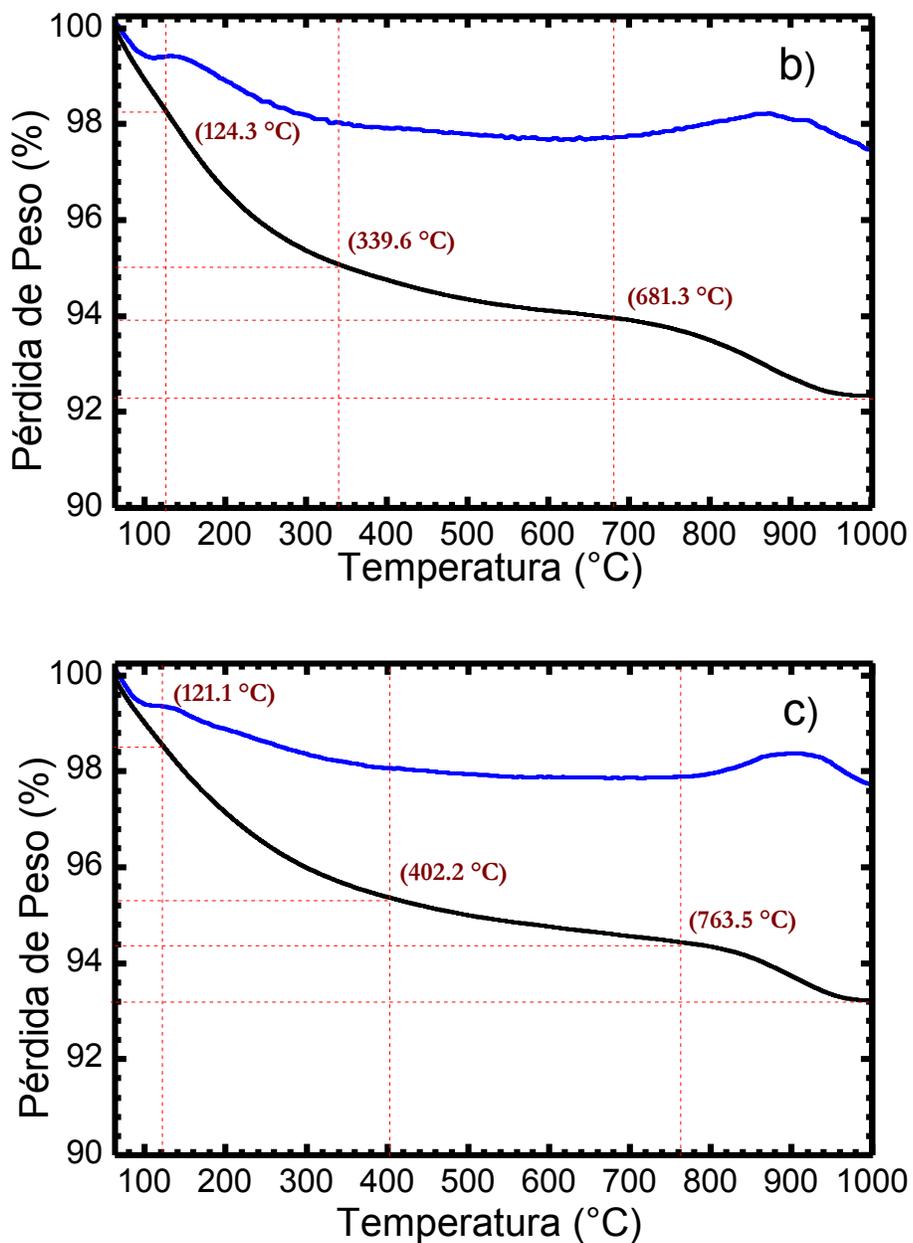


Figura 7. Análisis termogravimétrico: a) HAb; b) HAm; c) HAS

### 3.4 Difracción de Difracción de rayos X

Los resultados obtenidos de acuerdo al análisis por difracción de difracción de rayos X, de los materiales sintetizados: HAb, HAm y HAS en la Figura 8, presentan picos característicos de la hidroxiapatita, localizados a  $2\theta = 10.7571, 16.7360, 21.8666, 22.9170, 25.7449, 28.0475, 29.0980, 31.9258, 32.8954, 34.0266, 39.9247, 42.1063, 43.8838, 46.8329,$

48.2064, 49.5396, 50.5899, 53.1350, 61.7399, 64.0426, los cuales son muy similares a los presentes en la carta cristalográfica (JCDs-024-0033).

En el difractograma de la Figura 8 había presencia fases secundarias en ninguna de las muestras, HAb, HAm y HAs. De forma paralela, se identifica que la celda es de tipo hexagonal con grupo espacial  $P6_3/m$ . Estos resultados coinciden con la espectroscopia infrarroja FT-IR realizado para las muestras de hidroxiapatita.

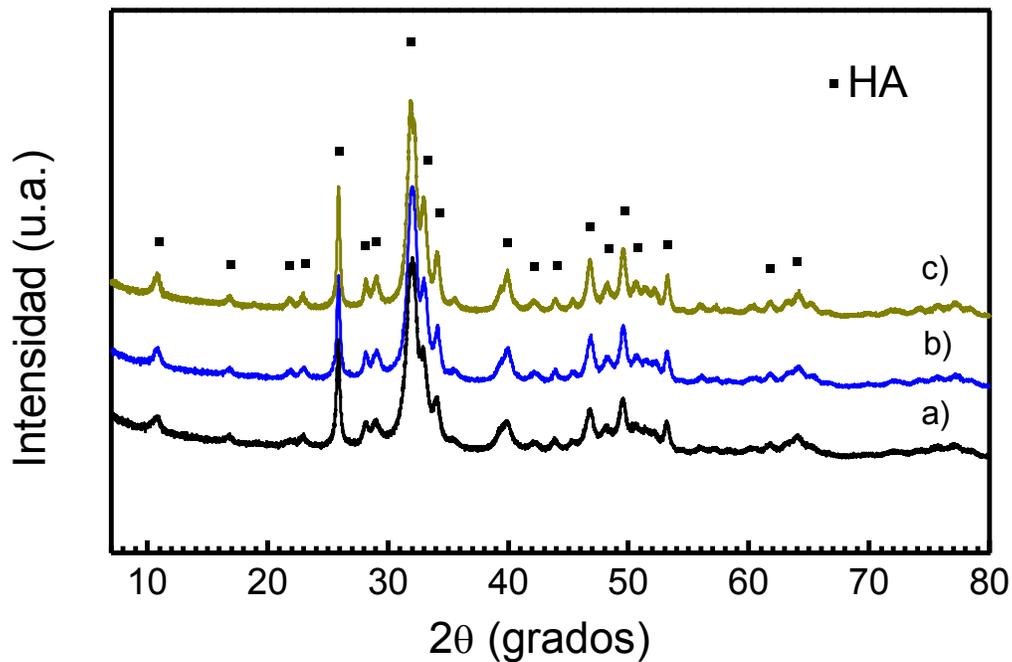


Figura 8. Patrones de difracción de difracción de rayos X: a) HAb; b)HAm; c) HAs

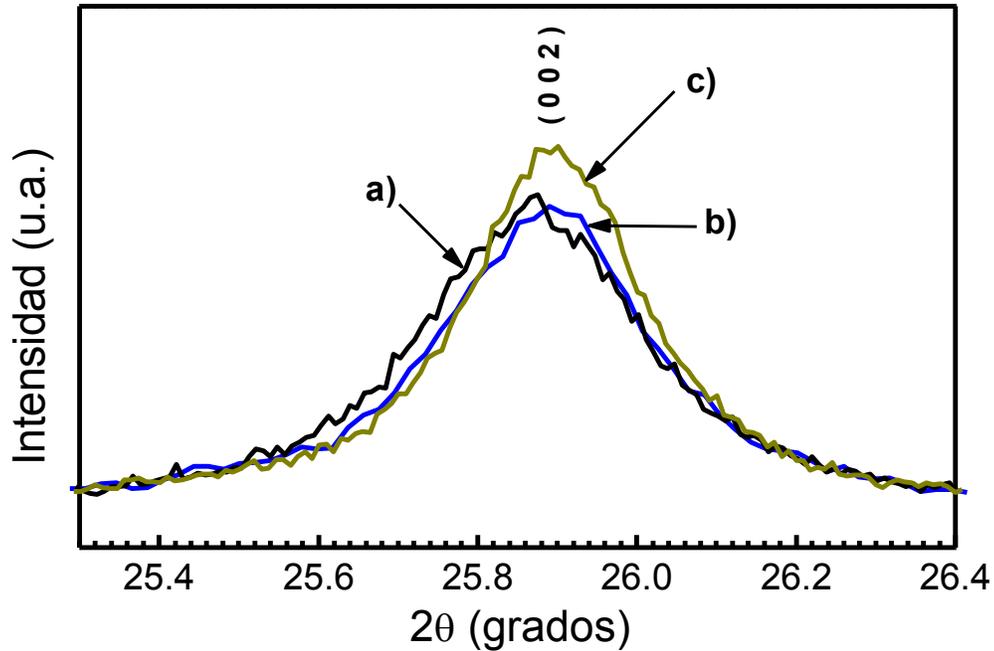


Figura 9. Difracción de rayos X pico correspondiente al plano ( 0 0 2 ) de muestras: a) HAb; b) HAm; c) HAS

En los difractogramas mostrados en la Figura 9 se observa en el pico correspondiente al plano ( 0 0 2 ) una mayor intensidad en la muestra HAS comparada con las muestras HAb y HAm, lo cual corrobora el crecimiento alargado de las partículas, mostrado en la Figura 11 c). Además sugiere que el crecimiento del cristal es en la dirección del eje “c” (C. Chen 2011).

### 3.5 Refinamiento con Rietveld

Haciendo uso de los patrones obtenidos con difracción de rayos X, se procedió al refinamiento con Rietveld apoyándonos con el software TOPAS 3. A continuación se muestran en la Figura 10 los refinamientos con Rietveld realizado en las muestras: HAb, HAm y HAS.

La técnica, es utilizada ampliamente para la caracterización de materiales cristalinos. Ya que permite obtener con mayor precisión, parámetros de red, posiciones atómicas, microdeformaciones, tamaño de cristal y cuantificar las fases cristalinas presentes en el material de interés.

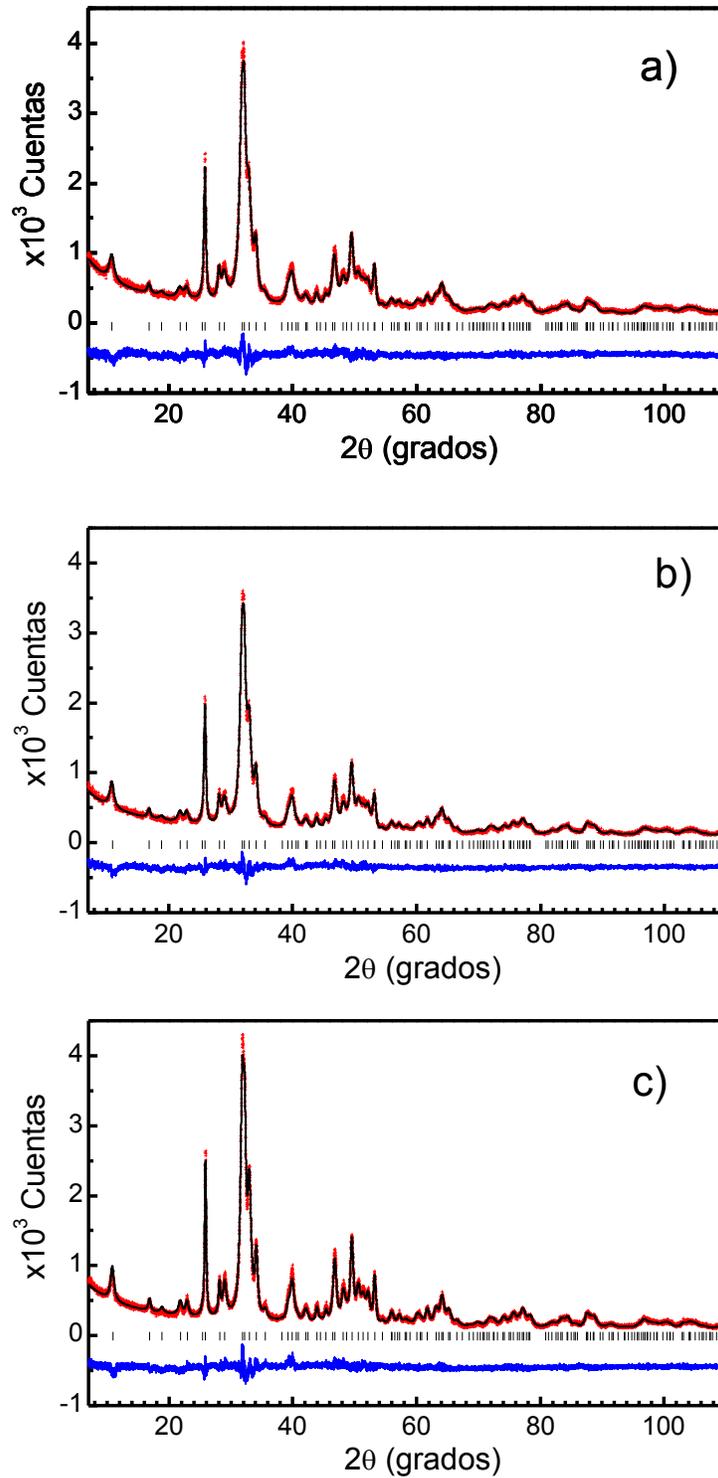


Figura 10. Análisis Rietveld en los difractogramas de las muestras: a) HAb; b) HAM; HAs. Los datos experimentales se indican con cruces rojas y el perfil calculado se muestra con la línea negra continua. Las líneas negras verticales localizadas debajo de los patrones de difracción corresponden a las reflexiones de Bragg.

Tabla 5. Tamaño de cristal promedio muestras: HAb, HAm y HAs, con refinamiento Rietveld.

Muestras	a (nm)	c (nm)	Tamaño promedio de cristal (nm)	Desviación estándar (nm)	$\Delta a$ (%)	$\Delta c$ (%)	$R_{wp}$ (%)	% de Cristalinidad
HAb	0.9415	0.6886	12.5669	$\pm 0.001$	0.01	0.17	6.599	65.78
HAm	0.9400	0.6885	15.1882	$\pm 0.001$	0.18	0.16	7.753	54.33
HAs	0.9408	0.6882	17.9036	$\pm 0.001$	0.09	0.11	7.557	53.81

Los resultados obtenidos con el refinamiento por Rietveld y los difractogramas medidos con difracción de rayos X, corroboran que las muestras tienen una celda tipo hexagonal. De acuerdo a lo que se muestra en la Figura 10, y haciendo uso de los parámetros de red reportados en la referencia (J. M. Hughes 1989) se observa decremento en el parámetro “a” e incremento en el parámetro “c” (M. Manda-Guiba 2014) este comportamiento se presenta en todas las muestras. La muestra HAb con el mayor incremento (0.17 %) en el parámetro “c”, mientras que la muestra HAs el menor (0.11 %). Con respecto al parámetro “a” en la muestra HAm se observó el mayor decremento (0.18 %) y el comportamiento opuesto se observa en la muestra HAb.

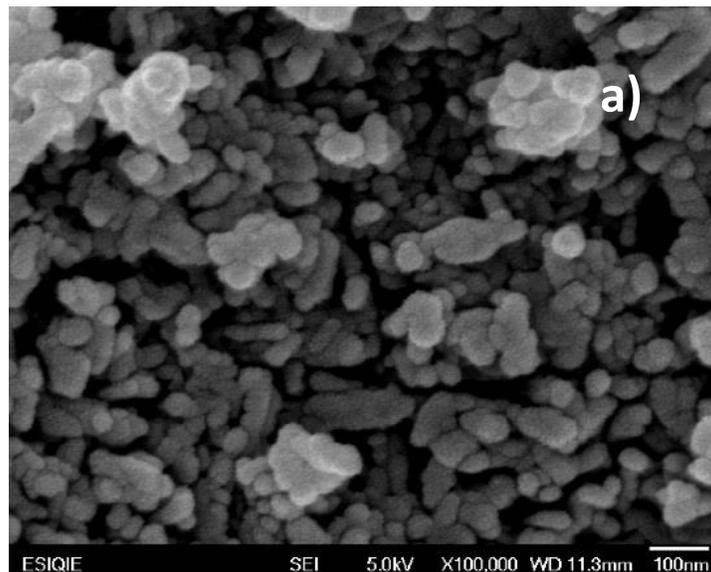
Por lo anterior, la muestra HAb fue la más influenciada en el parámetro “c”, mientras que las muestras HAm y HAs presentaron prácticamente el mismo comportamiento: el porcentaje de disminución en el parámetro “a” fue el porcentaje de incremento en el parámetro “c”. Por lo antes mencionado se sugiere que el mecanismo de agitación juega un papel importante en el reemplazo de los átomos dentro de la celda unidad de la hidroxiapatita, promoviendo la sustitución de iones carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) en sitios fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) tipo B (P. X. X. Guo 2006). Cabe resalta que la incorporación de carbonatos en la red cristalina inhiben el crecimiento del cristal (M. Manda-Guiba 2014) (C. Rey 2007) lo que está en acuerdo con la tendencia decreciente en las intensidades de los grupos fosfato (HAs > HAm > HAb) presentes en espectroscopia Raman, y con los tamaños promedio de cristal, crecientes, en las muestras (HAs>HAm>HAs).

Por lo que se sugiere una menor ocupación de los grupos carbonatos dentro de la red cristalina de la muestra HAs, y en consecuencia se propicia el crecimiento del cristal en comparación con las muestras HAm y HAb. Mientras que la muestra HAb presentó el efecto contrario, con intensidades más bajas en las bandas de fosfatos, y tamaño de cristal más pequeño en contraste con las muestras HAs y HAm. Las ideas expuestas están en conformidad con el análisis de espectroscopia infrarrojo FT-IR y Raman.

Por último el porcentaje de cristalinidad en todas las muestras se calculó colocando una nueva fase, correspondiente a la fase amorfa en el sistema, y dejando fijas los parámetros de red y las posiciones atómicas de dicha fase. Los resultados obtenidos fueron 65.78, 54.33 y 53.81 % en las muestras HAb, HAm y HAs, respectivamente.

### 3.1 Microscopía de barrido

En la Figura 11 se observan las micrografías de microscopía de barrido de las muestras HAb, HAm y HAs. Donde las partículas de las muestras HAm y HAs son alargadas entre 30 – 50 nm y 30 – 75 nm, respectivamente, siendo la más alargada la muestra HAs (Figura 12). Mientras que las partículas de la muestra HAb son redondas, con tamaños entre 20 – 40 nm. Con ayuda del programa J image se realizó el análisis del tamaño de partícula, Figura 12. Lo anterior es congruente con difracción de rayos-X, ya que en los difractogramas mostrados en la Figura 9, se presenta mayor intensidad en el pico correspondiente al plano (0 0 2), de la muestra HAs, en contraste con las muestras HAb y HAm. Lo cual, corrobora el crecimiento alargado de las partículas, mostrado en la Figura 11 c). Asimismo sugiere que el crecimiento del cristal es en la dirección del eje “c” (C. Chen 2011).



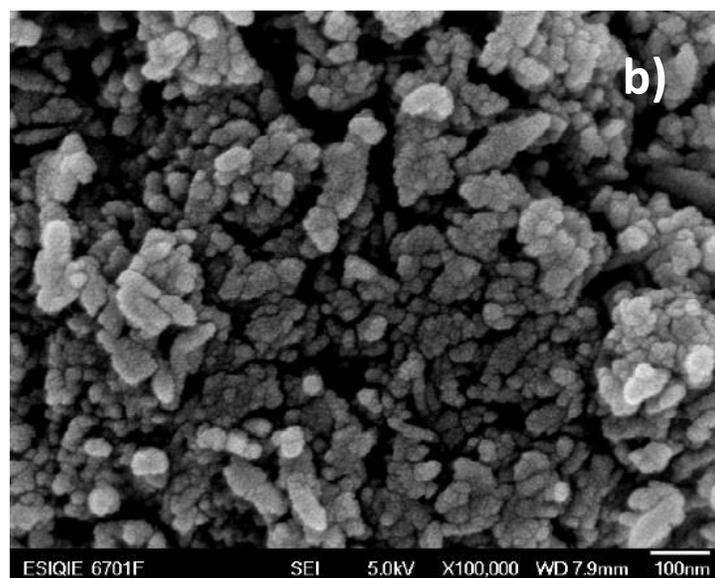


Figura 11. Micrografías de las muestras: a) HAb; b) HAm; c) HAS

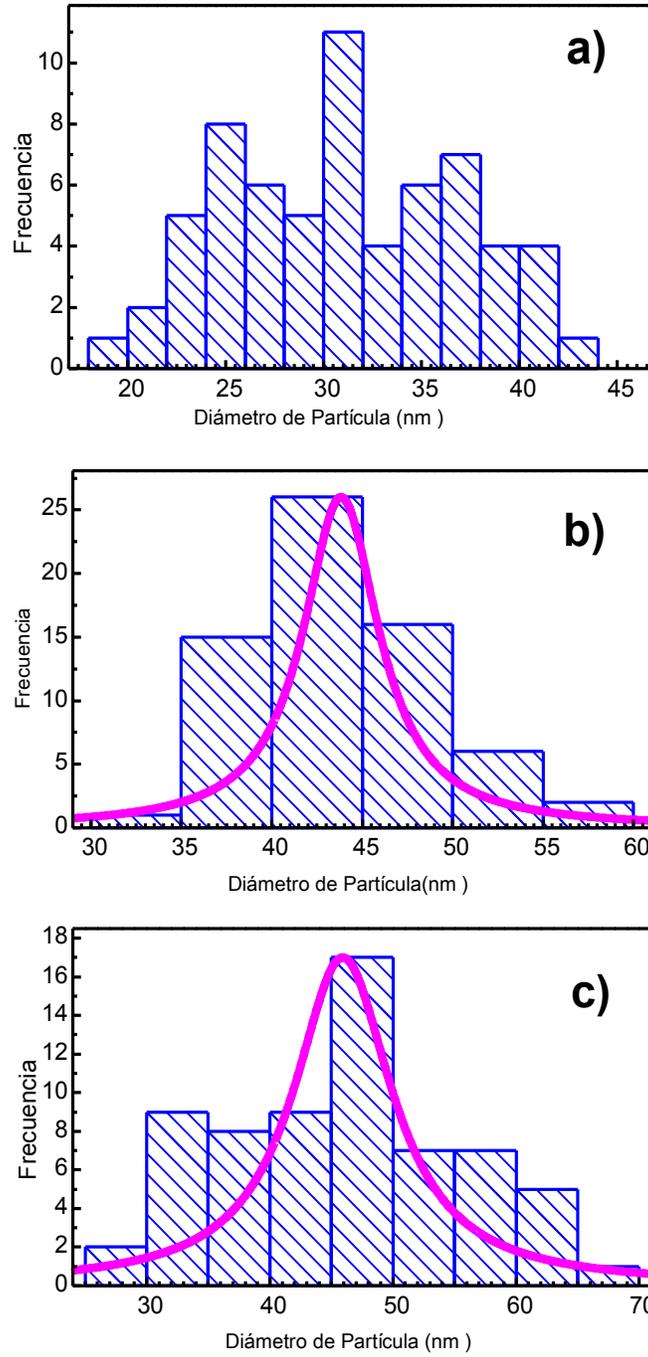


Figura 12. Tamaño de partícula muestras: a) HAB; b) HAM; c) HAS

### 3.2 Microscopía de transmisión

Los patrones de difracción de electrones (Figura 13) tomados de las muestras: HAb, HAm y HAS consisten en anillos concéntricos policristalinos, correspondientes a la fase de hidroxiapatita con presencia de material amorfo. Por otro lado el espaciamiento interplanar concuerda con las distancias interplanares de la carta cristalográfica # 09-0432, que corresponden a la fase hidroxiapatita (Figura 14). Asimismo, estos resultados corresponden a los patrones de difracción de difracción de rayos X observados en las muestras de hidroxiapatita (I. A. Figueroa 2012) (Y. Yuan 2008).

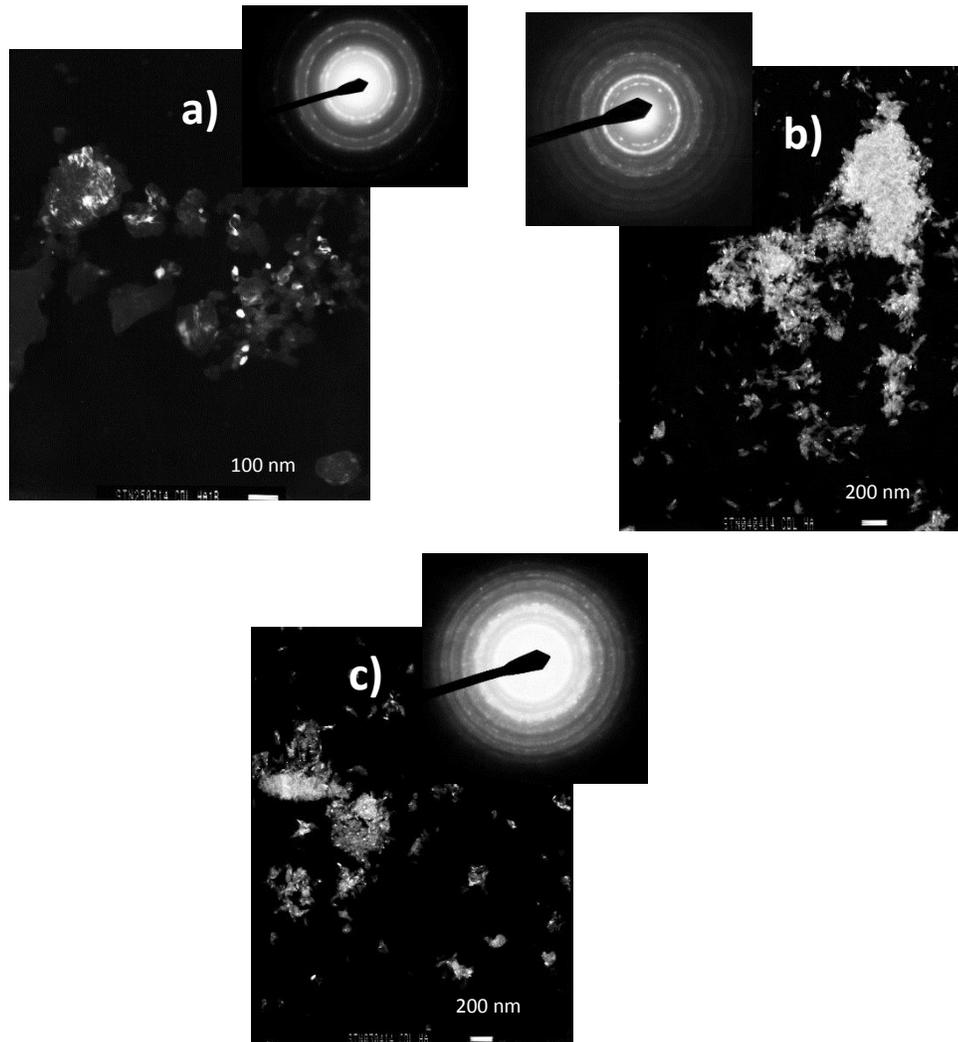


Figura 13. Micrografías con microscopia electrónica de transmisión de muestras de hidroxiapatita: a) HAb; b) HAm; c) HAS

En las micrografías MET de los polvos de hidroxiapatita, mostrados en la Figura 13, se aprecia un tamaño cristalino grande en la muestra c) HAs comparado a las muestras a) HAb y b) HAm. Siendo posible cotejar lo anterior con los resultados obtenidos con el refinamiento Rietveld. El tamaño de partícula aumentó en la muestra HAs asistida con punta ultrasónica. Mientras que el comportamiento contrario se presnt en las muestras HAb y HAm. Lo anterior puede atribuirse al mismo efecto de agitación de alta frecuencia descrito en la espectroscopia Raman.

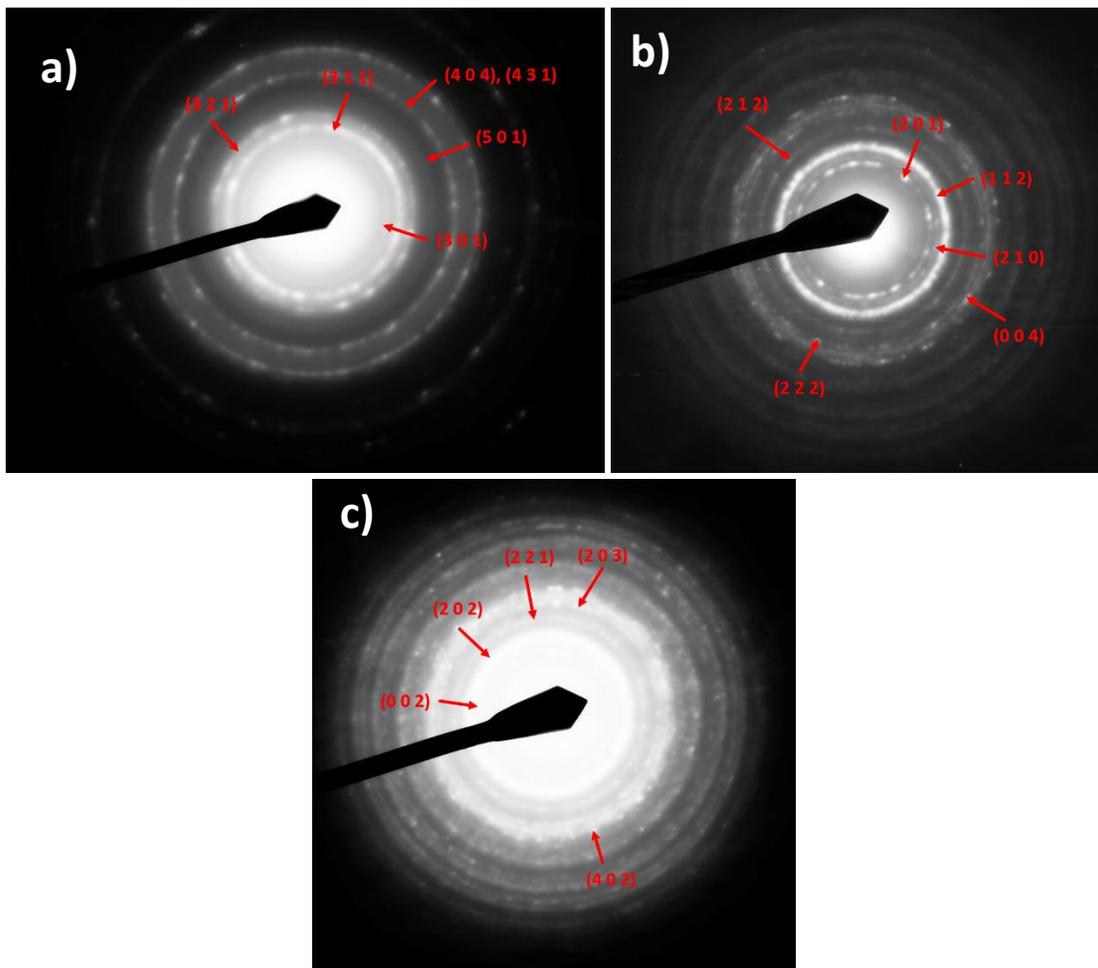


Figura 14. Patrones de difracción TEM muestras: a) HAb; b) HAm; c) HAs

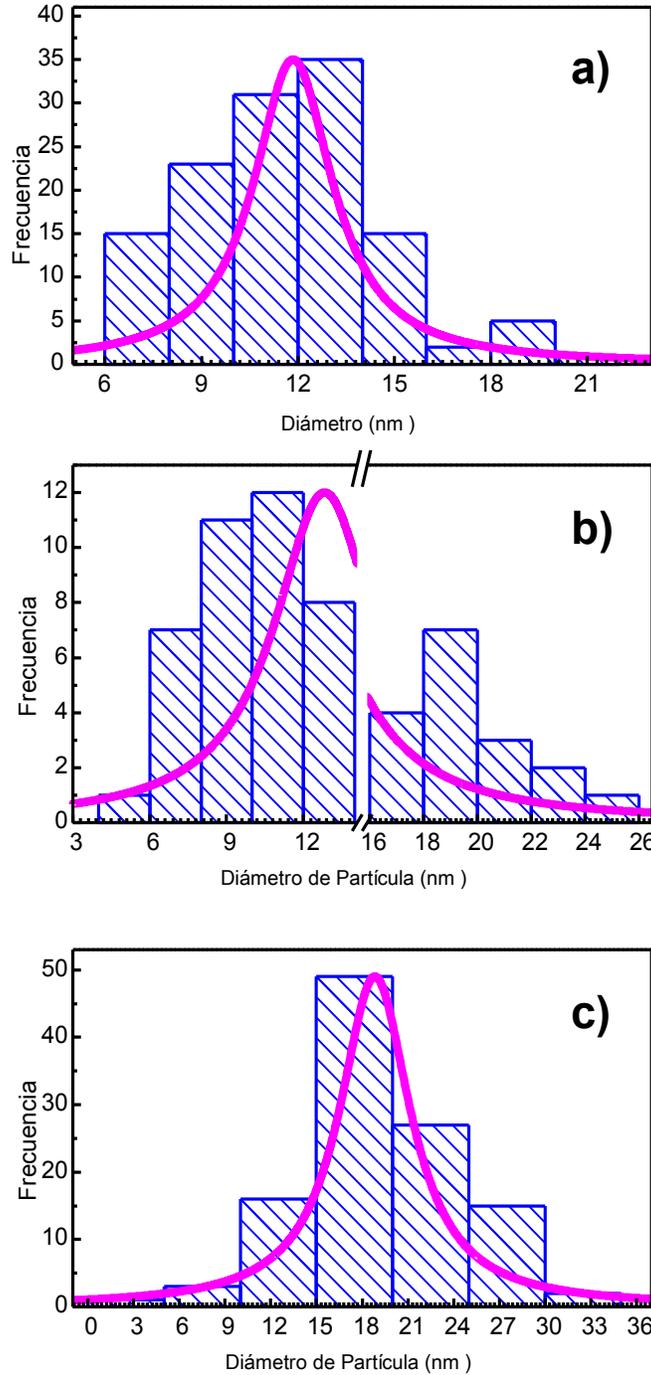


Figura 15. Tamaño promedio cristal por MET

De acuerdo a las imágenes de campo oscuro de MET (Figura 13), hay una variación en los tamaños y las formas de las nanopartículas (Figura 15). El diámetro de poco más de 50 cristales o granos, se midieron en las micrografías de campo oscuro. Los resultados

obtenidos demuestran una gran similitud con los calculados con refinamiento Rietveld (Tabla 6).

Tabla 6. Tamaño promedio de cristal promedio con TEM y refinamiento Rietveld

Muestras	Tamaño promedio de cristal MET (nm)	Desviación estándar	Tamaño promedio de cristal Rietveld (nm)	<sup>4</sup> Desviación estándar (%)
HAb	11.85	± 3.00	12.57	5.86
HAm	12.83	± 4.83	15.18	16.86
HAs	18.83	± 5.67	17.90	5.05

Los tamaños de cristal utilizando por MET y Rietveld fueron muy similares en las tres muestras (HAb, HAm, HAs). Ambos análisis muestran que los tamaños nanocristalinos.

### 3.3 Superficie específica

La medición de área BET, fue realizada para determinar la superficie específica de los polvos de hidroxiapatita, la cual fue de 81.6, 59.4 y 46.5 m<sup>2</sup>/g correspondientes a las muestras HAb, HAm y HAs, respectivamente. Estos resultados muestran una relación inversamente proporcional a las mediciones realizadas con refinamiento Rietveld, MEB y MET (Tabla 7). Ya que la muestra HAb, con menor tamaño de partícula y tamaño promedio de cristal, presento mayor superficie específica en comparada con las muestras HAm y HAs.

---

<sup>4</sup> Desviación estándar entre los tamaños promedio de cristal de MET con respecto al refinamiento con Rietveld.

Tabla 7. Comparación de la superficie específica de muestras: HAb, HAm y HAs, con tamaños de partícula y tamaño promedio de cristal.

	SSA (m <sup>2</sup> /g)	Tamaño de Partícula (nm)	Tamaño promedio de cristal (nm)
HAb	81.6	20 – 40	12.57
HAm	59.4	30 – 50	15.18
HAs	46.5	30 – 75	17.90

### 3.4 Análisis elemental

El análisis elemental permitió determinar la relación Ca/P, que es una característica importante de la hidroxiapatita. Por lo anterior, en la Tabla 8 se resumen los resultados experimentales, los cuales indican que en todas las muestras, (HAb, HAm y HAs), la relación Ca/P osciló entre 1.56 ~ 1.61. Estos resultados difieren del valor teórico (Ca/P = 1.67). Por lo anterior, se sugiere que las muestras son hidroxiapatitas tipo B, deficientes en calcio (Ca/P < 1.67). Cabe resaltar que en los sistemas biológicos, no hay presencia de apatitas estequiométricas. Además, en apatitas biológicas los iones carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) son los sustituyentes predominantes para los iones fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) (tipo B) (Michele Iafico 2014).

Tabla 8. Análisis químico calcio / fósforo

	Ca (mol)	P (mol)	Relación Ca / P	Desviación estándar con respecto a Ca / P = 1.67
HAb	1.884	1.174	1.605	± 3.97
HAm	1.786	1.123	1.590	± 4.91
HAs	1.868	1.194	1.564	± 6.56

Lo anterior corresponde con los resultados obtenidos por espectroscopia infrarroja y refinamiento con Rietveld, donde se sugirió que las muestras eran hidroxiapatitas tipo B, lo anterior de acuerdo a las bandas presentes en los espectros (M. Iafisco 2014).

### 3.5 Pruebas biológicas

Para las pruebas de respuesta celular realizadas en los tres biocerámicos sintetizados, se realizaron pruebas de biocompatibilidad para analizar la proliferación y la expresión de la actividad de fosfatasa alcalina que nos da un indicio de la bioactividad en las biocerámicas.

### 3.6 Proliferación

El ensayo Presto Blue se llevó a cabo para determinar proliferación de células mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSC) que se cultivaron en los andamios de interés: HAb, HAM y HAs, durante 3, 5, 7, 14 y 21 días de cultivo celular.

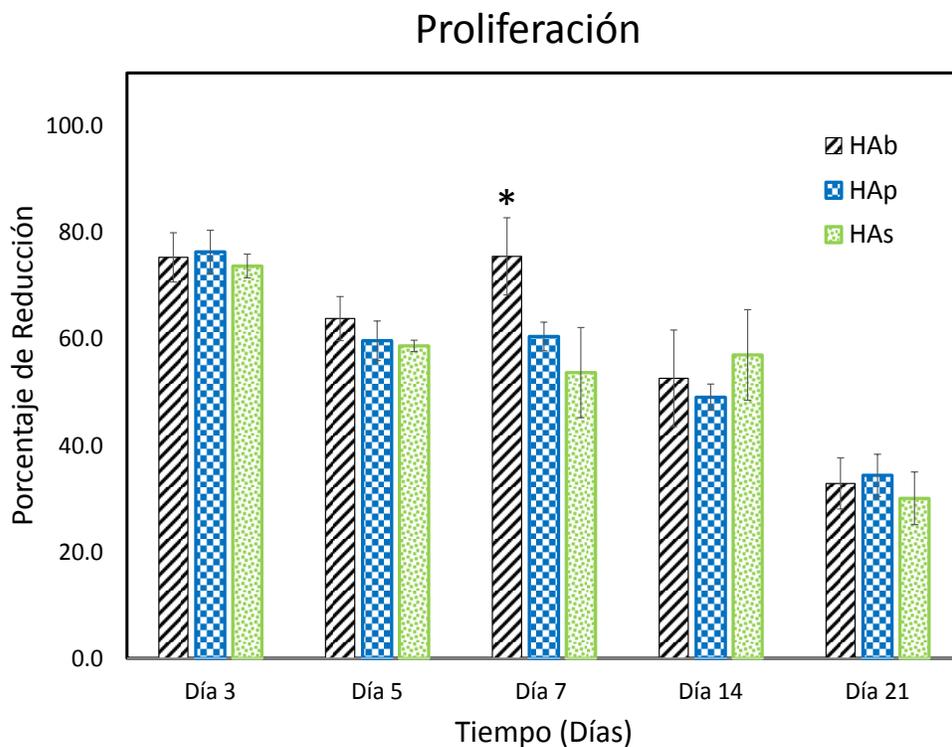


Figura 16. Proliferación de células mesenquimales sobre andamios de hidroxiapatita: HAb, HAM y HAs, después de 3, 5, 7, 14 y 21 días de cultivo. Las muestras HAb, HAM y HAs, presentan diferencia significativa ( $* < 0.05$ ) comparada con la muestra control (CP = 100 %).

Como se puede observar en la Figura 16; el crecimiento celular de las células BM-MSc sobre nuestros andamios presentaron un crecimiento en el tiempo hasta los 21 días sin mostrar ningún efecto de citotoxicidad celular, debido a que el porcentaje de reducción del reactivo presto blue está por arriba del 50%. Lo que indica que la mitocondria donde se lleva a cabo el proceso de conversión del reactivo esta funcional y es un indicativo de que las células siguen vivas y proliferando.

Al día 3 de cultivo se puede observar que las muestras HAb, HAm, HAS tienen un máximo de proliferación que puede traducirse como viabilidad celular, y especialmente la muestra HAm tiene diferencias estadísticamente significativas cuando se compra con el control ( $* < 0.05$ ). En el día 5 se observa una disminución de proliferación en todas las muestras. Cabe mencionar que la reducción no significa que exista una toxicidad del material; sino más bien se interpreta como una bioactividad del material que está induciendo a las células troncales a una diferenciación celular hacia el linaje osteoblástico. El anterior comportamiento por ende puede atribuirse a una temprana diferenciación celular, que sería la fase temprana del proceso de biomineralización celular, donde las células BM-MSc empiezan a cambiar su fenotipo de troncales a pre-osteoblastos, periodo que abarca desde el día 5 al día 14 aproximadamente (E. Birmingham 2012). Al día 7 la proliferación en la muestra HAb presenta diferencia significativa ( $* < 0.05$ ) con respecto al control. Siendo esta última, de forma global la que presento mayor significancia. Y por último, al día 21 hay una disminución de las tres muestras con respecto a los días anterior, lo cual sugiere la presencia de una segunda fase de maduración celular que ocurre entre la semana 2 o 3 (Hoeman C. D. 2009). Esta fase incluye la diferenciación celular de los pre-osteoblastos a osteoblastos maduros y los cuales empezaran a depositar la matriz extracelular del tejido mineral de hueso.

De acuerdo a los resultados del análisis estadístico, se observa que el porcentaje de reducción de resofurina, como indicador de viabilidad celular, para la muestras HAb presento diferencia significativa con respecto a las muestras HAm y HAS. Lo que sugiere que las células mesenquimales se adhieren en los primeros 3 días de cultivo celular y proliferan de manera distinta en las tres muestras, siendo uno de los factores importantes el tamaño nanométrico de las partículas para promover la adhesión y proliferación celular. Lo anterior coincide con las micrografías de barrido y área BET, ya que la muestra HAb con menor tamaño de partícula (20 – 40 nm), y por tanto con superficie específica más grande 81.6 m<sup>2</sup>/g fue la que presento diferencia significativa sobre las muestras HAm y HAS (Y. Zhao 2006) (Singh S. S. 2014). A su vez partículas de tamaño pequeño tienen más átomos en la superficie y una mayor proporción de átomos deslocalizados en comparación a partículas de tamaño mayor. Tales propiedades también influyen en la interacción de adhesión celular (Singh S. S. 2014). También, un proceso fundamental en la regeneración de tejido óseo, es que se lleve primeramente la adhesión celular en la superficie del biomaterial, para

posteriormente llevar a cabo la proliferación y diferenciación celular. Nuestros estudios indican que durante los primeros 3 días de cultivo existe un aumento en la adhesión celular con un incremento en la proliferación celular, las cuales son las fases iniciales de cualquier proceso de regeneración tisular. Y posteriormente del día 5 al 21 las fases de diferenciación y maduración celular. Cabe resaltar que al ser las muestras HAb, HAm y HAs al ser deficientes en calcio tienen un potencial de bioactividad superficial que lleva a la inducción de la diferenciación de las células madres mesenquimales hacia osteoblastos.

### 3.7 Fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina es una enzima (ALP) secretada por las células durante las etapas tempranas del proceso de diferenciación celular. Se encarga de hidrolizar moléculas que contienen grupos fosfatos, lo que promueve el depósito de una matriz mineralizada debido al aumento en concentración de grupos  $\text{PO}_4^{-3}$  (Singh S. S. 2014). La actividad de ALP se midió después de 3, 5, 7, 14 y 21 días de cultivo celular. De acuerdo a lo mostrado en la Figura 17 después del día 5 de cultivo la actividad de la ALP se incrementa en todas las muestras, siendo la muestra HAs la que presentó incremento significativo en la actividad de ALP. Lo anterior puede deberse a que la fosfatasa alcalina es un marcador temprano en el proceso de diferenciación celular (H. Nagai 2015). También es posible vincular el grado de cristalinidad de las muestras y el efecto en la actividad ALP. Ya que en la muestra menos cristalina HAs (53.8 %) propicio más actividad enzimática de ALP, observándose el efecto contrario con la muestra más cristalina HAb (65.8 %) (M. E Marsh 1995).

Debido a que el depósito de matriz mineralizada por parte de los pre-osteoblastos y osteoblastos está en función de la disponibilidad de iones fosfatos por parte de la enzima ALP; es necesario correlacionar estos resultados enzimáticos con los resultados obtenidos por refinamiento Rietveld y Raman. Con el refinamiento Rietveld se observa (Figura 10) que el parámetro “c” para la muestra HAs, fue la que menos incremento, lo cual sugiere que la sustitución de grupos carbonatos ( $\text{CO}_3^{-2}$ ) es menor y por tanto la disponibilidad de grupos fosfatos ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) es mayor en comparación con las demás muestras HAb y HAm. Asimismo con la muestra HAs, se identifica un incremento en las bandas correspondientes a fosfatos, sobre todo la banda localizada a  $947\text{ cm}^{-1}$ . Lo cual coincide con los resultados de la actividad de ALP antes expuestos (M. E Marsh 1995). Esto nos lleva a suponer que la cristalinidad del material, el tamaño de partícula y la presencia de los grupos funcionales juega un papel importante en el momento de analizar la respuesta de diferenciación celular de las células madres mesenquimales (BM-MSC). Cabe destacar que las células son capaces de sentir dichas características de las biocerámicas y por ello se ha logrado obtener una mayor

actividad de ALP en la biocerámicas HAs. Tanto en la fase temprana como en la fase tardía de la biomineralización.

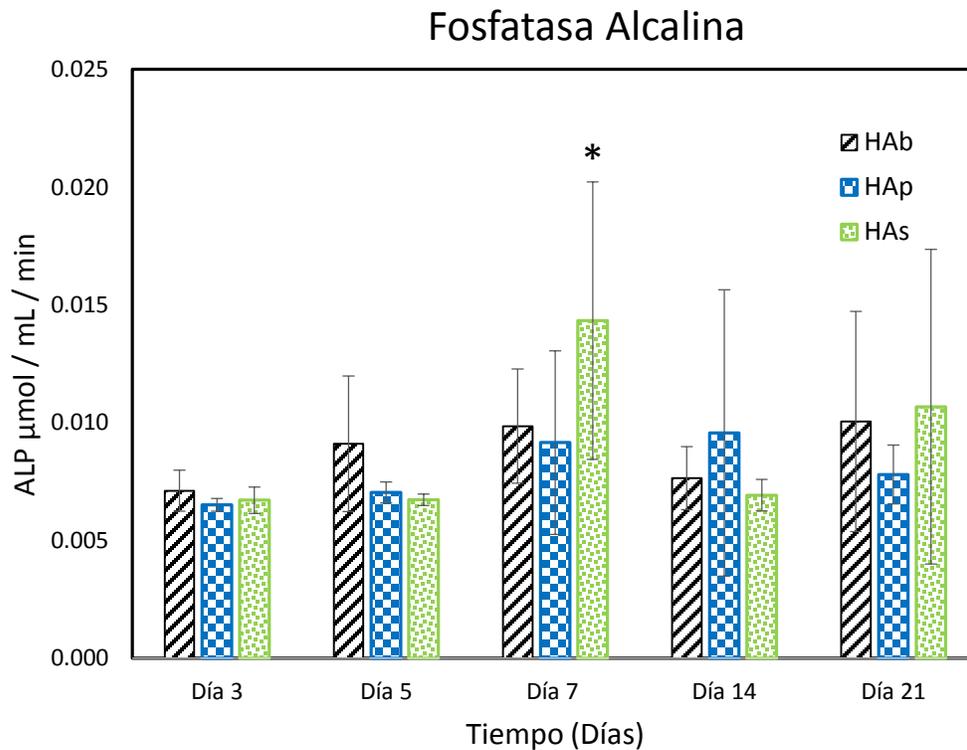


Figura 17. Análisis de fosfatasa alcalina en células mesenquimales sembradas sobre andamios de hidroxapatita (HAb, HAm y HAs), después de 3, 5, 7, 14 y 21 días de cultivo. La muestra HAs al día 7 de cultivo mostró diferencia significativa (\* < 0.05) comparada con la muestra control.

En la Figura 18 se observan las micrografía de los materiales: HAb, HAM y HAs con posible nódulos de matriz mineralizada depositada sobre sus superficies por la células BM-MSc que han sufrido un cambio fenotípico diferenciándose hacia osteoblastos. Dado que la actividad de la ALP sufre una disminución en su actividad después del día 7, podría estar sucediendo que la bioactividad de las cerámicas este influenciando una diferenciación y un incremento en el depósito de matriz con lo cual podría sugerir, la presencia de una segunda fase de maduración celular que ocurre entre la semana 2 o 3 (Hoeman C. D. 2009). Sin embargo; se necesitan realizar más estudios para entender el comportamiento de la diferenciación celular sobre nuestras biocerámicas.

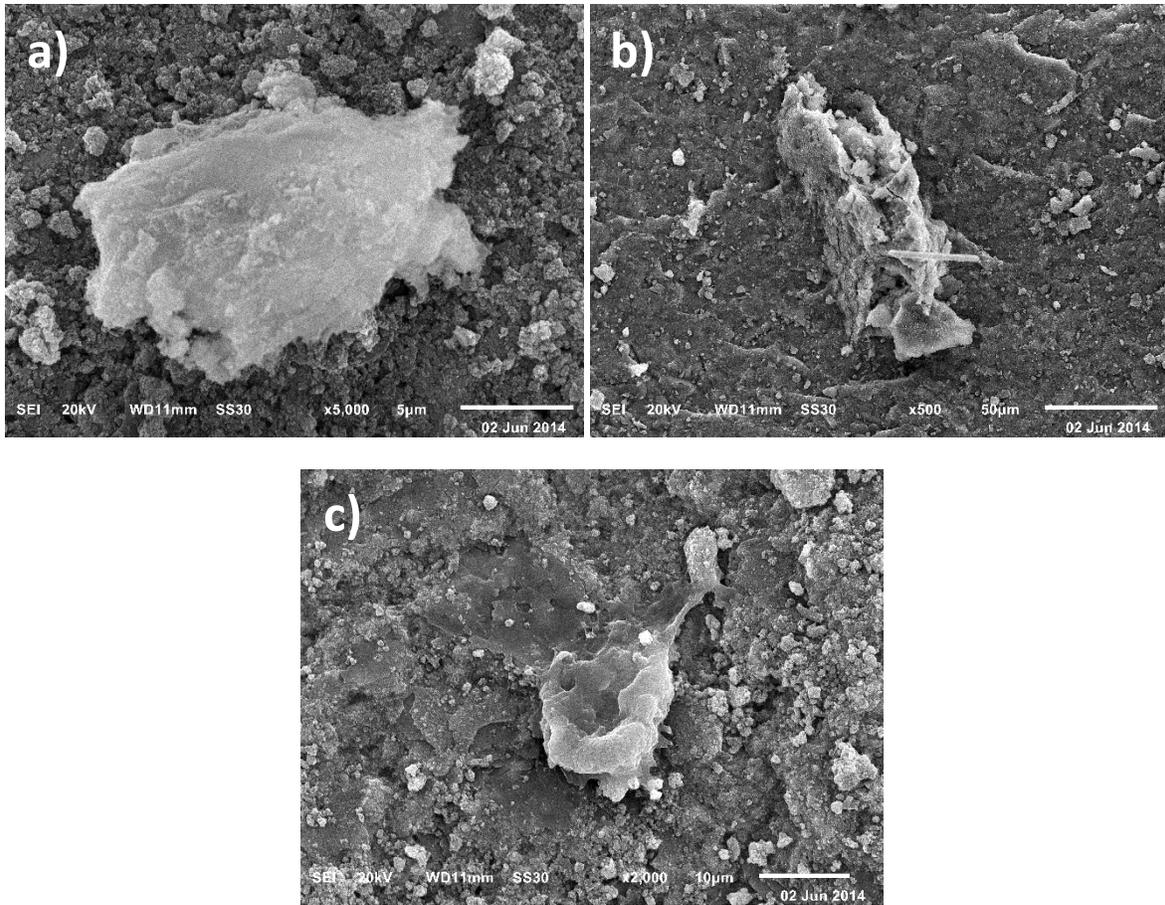


Figura 18. Micrografías de barrido de posible material mineralizado sobre las muestras:  
a) HAB; b) HAM; c) HAS

## **Conclusiones**

- En este trabajo, se sintetizaron tres materiales cerámicos HAb, HAm y HAs, con fase correspondiente a una hidroxiapatita tipo B, deficiente en calcio.
- Los tres materiales HAb, HAm y HAs, en los estudios de biocompatibilidad presentaron resultados favorables en las pruebas de actividad de fosfatasa alcalina y de bioactividad, ya que no hubo algún tipo de respuesta adversa o de toxicidad en los estudios biológicos.
- La biocerámica HAb sintetizada por co-precipitación, favoreció significativamente la respuesta de bioactividad celular. Lo anterior, debido a los cambios estructurales y microestructurales, por efecto en el mecanismo de agitación empleado durante la síntesis. Como se observó en los resultados de caracterización.
- La biocerámica HAs, favoreció significativamente el proceso de mineralización, de acuerdo a los resultados obtenidos de fosfatasa alcalina. Lo anterior, debido a la respuesta de las células mesenquimales (BM-MSC) para adoptar un cambio fenotipo, dando lugar a la diferenciación celular hacia osteoblastos, para su posterior maduración y depósito de matriz extracelular mineralizada a manera de nódulos.

### **Perspectiva a futuro**

- Las hidroxiapatitas HAb y HAs sintetizadas aquí, son los candidatos para seguirse estudiando en los procesos de biomineralización como futuros materiales de implante en defectos óseos. Con lo que se propone como proyecto a futuro, la obtención de una biocerámica que presente características similares a las muestras HAb y HAs, que potencialicen la respuesta de biocompatibilidad y mineralización. Lo que se puede lograr combinando a distintas concentraciones los polvos HAb y HAs, para su posterior estudio de biocompatibilidad.

## Apéndice 1

### Nomenclatura

HA	Hidroxiapatita
HAb	Hidroxiapatita asistida con agitación de baño ultrasonico
HAm	Hidroxiapatita asistida con agitación magnética
HAs	Hidroxiapatita asistida con agitación de alta frecuencia, sonicador de punta.
FT-IR	Técnica espectroscópica infrarroja
Raman	Técnica espectroscópica Raman
TGA	Análisis termogravimétrico
DRX	Técnica de caracterización difracción de difracción de rayos X
MEB	Microscopia electronica de barrido
MET	Microscopia electronica de transmisión
BET	Área de superficie específica Brunauer-Emmett-Teller
ICP-OES	Análisis elemental plasma óptico

## Apéndice 2

### Técnicas espectroscópicas

#### Espectroscopia infrarroja-transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarrojo es una técnica análisis cuantitativo y cualitativo para determinar la estructura química de compuestos. De forma más específica, se cuantifican los niveles de energía de vibración de los enlaces del compuesto en estudio. Las distintas energías de vibración se deben a diferencias en la longitud de enlace y ángulo, que son posibles por el estiramiento y flexión de los enlaces. El diseño básico de un espectrómetro FTIR se muestra en la Figura 19. En donde un haz de IR incidente puede ser dividido pasando a través de un divisor de haz, hecho de un material que transmitirá la mitad de la luz y la otra mitad la reflejara. Este divisor de haz se coloca a 45° del haz inciden que es paralelo al espejo estacionario. El haz transmitido por el divisor de haz brilla en un espejo móvil dispuesto a 90° del haz incidente. Los dos haces son reflejados por los espejos fijo y móvil, respectivamente, y se recombinan para formar un haz resultante. Si los dos haces están en fase, la resultante será la suma de éstos, a este proceso se llama interferencia constructiva. De lo contrario, la resultante será más débil a la suma de los dos haces, conocido como interferencia destructiva (Sheehan 2000).

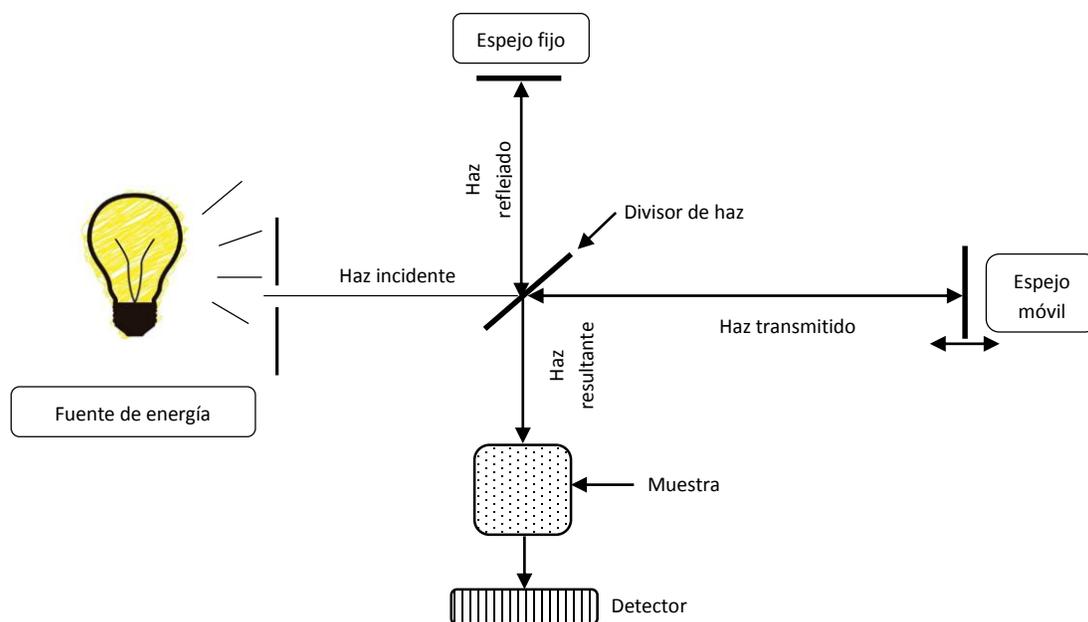


Figura 19. Diseño de un espectro FTIR

## Espectroscopia Raman (Raman)

La espectroscopia Raman es una técnica espectroscópica utilizada para estudiar los modos de vibración, rotación y otros, de los materiales a bajas frecuencia. La dispersión es la desviación de la luz de su dirección original de incidencia, este fenómeno se puede observar en las moléculas. Existen dos tipos de dispersión de luz monocromática. La dispersión Rayleigh, ocurre cuando la frecuencia de dispersión de la luz es la misma que la de incidencia. El proceso anterior es el resultado más común observado en una muestra. Mientras que, el proceso contrario, donde la frecuencia de dispersión de la luz puede ser mayor o menor que la de la luz incidente, se conoce como dispersión Raman (Figura 20). Debido a que la dispersión con Raman ocurre con una baja probabilidad, es común utilizar un emisor de luz láser de alta energía que emite luz de alta frecuencia. La relevancia de la espectroscopia Raman con respecto a espectroscopia IR se encuentra en el hecho de que las diferencias de energía entre la luz incidente y la dispersada Raman corresponde a transiciones de vibración. Por lo tanto la espectroscopia Raman es un medio que sirve para estudiar las transiciones vibratorias de los compuestos.

Con la dispersión Raman, una pequeña cantidad de energía es transferida de la luz incidente (frecuencia,  $\nu_i$ ) hacia la muestra, para llevarla de su estado basal a un nivel de vibración excitado. Esta pérdida de energía puede expresarse como  $\Delta\nu = \nu - \nu_i$ , donde  $\nu$  es la frecuencia de dispersión Raman.

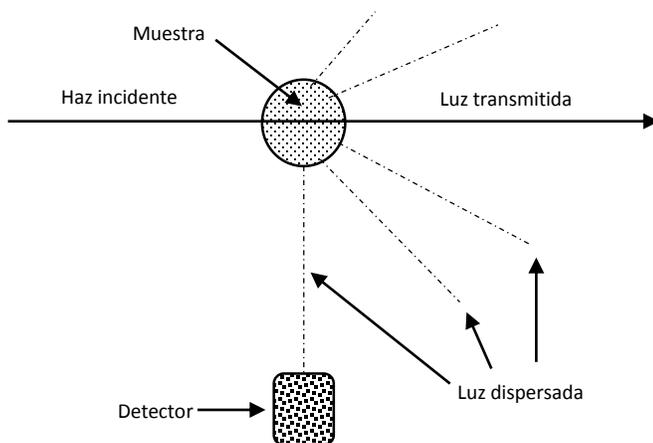


Figura 20. Esquema de dispersión de la luz

### Análisis Termogravimétrico (TGA)

Es una técnica que nos permite hacer mediciones de cambios de en el peso de la muestra en función de la temperatura o tiempo, mediante el uso de una termo-balanza. La muestra se somete a un programa de temperatura controlado de atmósfera específica. El análisis por TGA permite detectar procesos en donde se llevan a cabo variaciones de peso debido a descomposiciones, sublimaciones, reducciones, absorciones, desorciones, etc. La termobalanza de TGA consta de 5 partes principales; 1) microbalanza electrónica y su equipo de control, 2) horno y sensores de temperatura, 3) Programa de temperatura, 4) Control de atmósfera (caudal y tipo de gas) y 5) almacenamiento de datos peso y temperatura principalmente (Brown 1988).

Es una técnica mediante la cual el peso de una muestra puede seguirse en un periodo de tiempo mientras que la temperatura crece de manera lineal. Esta técnica ofrece la determinación de composición del material (Ewing 1985).

### Difracción de Difracción de rayos X (DRX)

La difracción con difracción de rayos X es una técnica que nos permite determinar el ordenamiento de los átomos en el interior de materiales cristalinos, así como el análisis cuantitativo y cualitativo de las fases presentes en la estructura. Esta información se obtiene a partir de la dispersión de un haz de difracción de rayos X dentro del cristal, lo que depende directamente del ordenamiento de los átomos dentro de la estructura.

Los difracción de rayos X son un tipo de radiación electromagnética de alta energía, con longitudes de onda de entre  $0.1 - 100 \times 10^{-10}$  m. Estos se generan bombardeando un objetivo de cobre o molibdeno con electrones acelerados a 10000 eV. La energía de bombardeo es absorbida provocando la dislocación de los electrones en los orbitales más internos K y M hasta los externos. Cuando los electrones han regresado a su estado base es cuando se emite la radiación de difracción de rayos X. En los análisis de cristalografía la radiación  $\lambda = 1.542 \times 10^{-10}$  m, también llamada rayos  $K_{\alpha}$ , se seleccionan haciéndolos pasar por un monocromador de grafito o por un filtro de níquel (Figura 21).

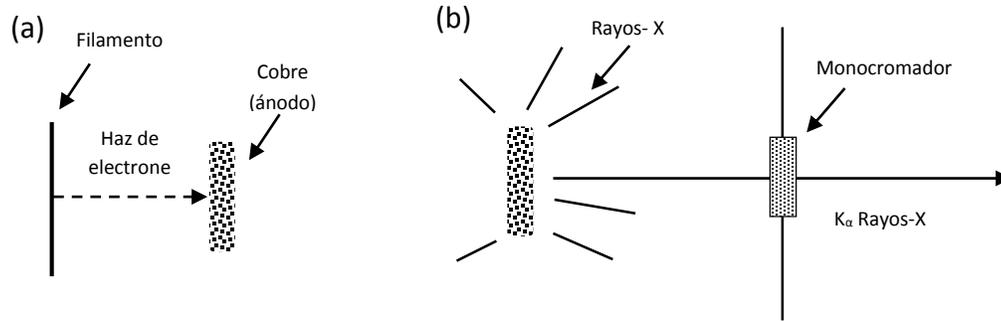


Figura 21. Fuente de rayos-X

### Refinamiento por método Rietveld

El método Rietveld es una técnica de refinamiento que permite determinar con mayor precisión parámetros estructurales de la muestra, así como la concentración de las fases involucradas. Lo anterior a partir de un modelo propuesto para el material que ajusta con el patrón de difracción experimental, empleando el método de mínimos cuadrados, donde los parámetros involucrados en el modelo se modifican hasta que la diferencia entre el difractograma calculado y el experimental es mínima. En el modelo teórico se toman en cuenta aspectos estructurales tales como: estructura cristalina, grupo espacial, posiciones atómicas en la celda unitaria, fases presentes en el material, etc. También en el modelo teórico se incluyen, tamaño de cristal, microdeformaciones y concentración de las fases. Y finalmente se incluye el factor instrumental.

### Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

El microscopio electrónico de barrido, es un instrumento diseñado para estudiar, en alta resolución, superficie de sólidos. Por lo que tanto, es una técnica muy útil en el estudio de las características morfológicas y topográficas de la muestra. El microscopio consiste básicamente de un haz de electrones, que es la fuente de iluminación, lentes condensadoras y lente objetiva. La imagen final se observa en la pantalla o en una placa fotográfica. Cuando el haz de electrones interacciona con la muestra se producen diversos tipos de señales, las cuales dan lugar a la caracterización estructural y química de ésta. Estas señales son: electrones retrodispersados, secundarios, absorbidos, Auger, transmitidos y difracción de rayos X característicos. En la Figura 22 se muestra un esquema de la interacción del haz electrónico y las señales que se producen.

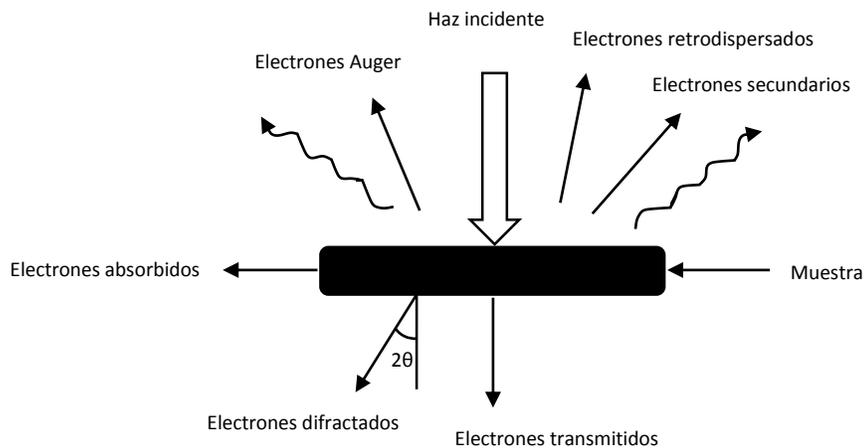


Figura 22. Señales que se producen durante la interacción del haz electrónico con la muestra

Los electrones secundarios y retrodispersados arrojan información superficial de la muestra, permitiéndonos obtener información sobre la morfología y topográfica de la misma (M. Jaffe 2013) (Miguel José Yacamán 1995).

### Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

La microscopia de MET utiliza un haz de electrones producidos por un emisor de electrones, los cuales se alinean con lentes electromagnéticas para iluminar una muestra delgada, montada por lo general sobre una malla metálica, para producir una imagen de los detalles estructurales de la muestra en cuestión. Al interactuar con la estructura interna de la muestra los electrones son dispersados o reflejados. Estos mecanismos son responsables en los contrastes observados con las imágenes de MET. Finalmente el haz transmitido es proyectado en una pantalla, formando una imagen aumentada de la muestra. Esta microscopia da información estructural: información cristalográfica, información composicional y morfología (M. Jaffe 2013).

### Área Superficial Específica Brunauer-Emmett-Teller (BET)

El método más ampliamente utilizado para determinar el área de superficie específica implica la medición de la cantidad de gas adsorbido sobre una superficie sólida a una temperatura próxima al punto de ebullición del gas (F. M. Nelsen 1958). La medición se

realiza a una temperatura dada en función de la presión del gas en equilibrio con el sólido. Nitrógeno es el gas más comúnmente utilizado como adsorbato.

Antes de iniciar con la medición la superficie sólida (muestra) debe estar limpia, por lo anterior se calienta a alto vacío para eliminar todas las posibles impurezas. Posterior al proceso de limpieza

### Análisis Elemental (ICP-OES)

La espectroscopia atómica se basa en la emisión de radiación de iones y átomos excitados, recolectar y medir los espectros emitidos de cada elemento. En un equipo ICP-OES, existen dos partes que son fundamentales para su buen desempeño, la atomización del plasma (ICP) y la óptica espectroscópica (OES). La atomización del plasma tiene se constituye por tres partes que son críticas que son: la radio frecuencia del generador, nebulización y la antorcha del plasma. La función del generador de radio frecuencia es proporcionar la mayor parte de radio frecuencia a la bobina a fin de crear y mantener un campo magnético estable. Por otro lado el sistema de nebulización sirve para transformar el fluido líquido en spray suspendidas en un gas acarreador, para posteriormente las gotas más pequeñas (diámetro entre 5 – 25  $\mu\text{m}$ ) pasen por el plasma. Finalmente la antorcha es un instrumento que propiciara la formación del plasma, se conforma por tres tubos concéntricos a través de los cuales se hace pasar gas argón (Zachariadis 2012), como se muestra en la Figura 23.

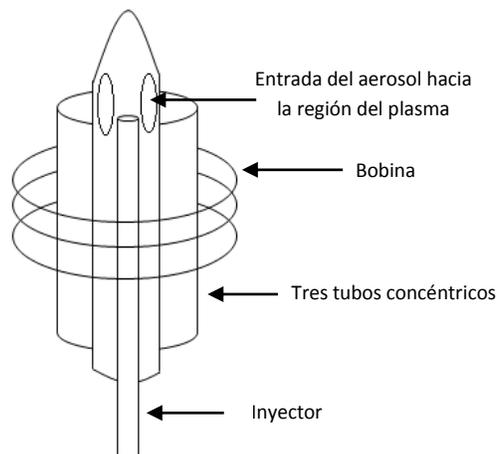


Figura 23. Esquema de ensamblaje de plasma acoplado inductivamente

Así como la parte instrumental del plasma es el corazón del ICP-AES, también la óptica juega un papel importante; Es allí donde se determinan las longitudes de onda la radiación emitida, y finalmente es convierte a una señal eléctrica.

## Referencia Bibliográfica

- A. Haider, K. C. Gupta, I. K. Kang. «Morphological Effects on HA on the Cell compatibility of Electrospun HA/PLGA Composite Nanofiber Scaffolds.» (Hindawi BioMed Research International) ID 308306 11 pages (2014).
- A. Krajewski, M. Mazzochi, P. L. Buldini, A. Ravaglioli, A. Tinti, P. Taddei, C.Fagnano. «Synthesis of carbonated hydroxyapatites: efficiency of the substitution and critical evaluation of analytical methods.» (Journal of Molecular Structure ) 744-747, nº 221-228 (2005).
- Akkaya, B. «Porous and Spherical Hydroxyapatite Microcomposites for Immunoglobulin G Adsorption.» *Polymer Science* 130 (2013): 2764-2771.
- Anselme, K. «Osteoblast adhesion on biomaterials.» (Elsevier Biomaterials) 21, nº 667-681 (2000).
- Askeland, Donald R. *Ciencia e Ingeniería de los Materiales*. Thomson Editors, S.A. de C.V., 1998.
- Brown, Michael E. *Introduction to Thermal Analysis Techniques and Applications*. New York: Chapman and Hall, 1988.
- C. C. Silva, A. G. Pinheiro, M. A. R. Miranda, J. C. Góes, A. S. B. Sombra. «Structural Properties of hydroxyapatite obtained by mecnosynthesis.» *Elsevier Solid State Sciences* 5 (2003): 553-558.
- C. Chen, J. li, X. Cheng, J. Yu, H. Wang, R. Chi, Y Hu. «Phase transformation process and step growth mechanism of hydroxyapatite whiskers under constant impulsion system.» (Journal of Crystal Growth) 327, nº 154 - 160 (2011).
- C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H.Sfihi, A. Barroug. «Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials.» (Elsevier Material science and engineering) C 27, nº 198 - 105 (2007).
- D. G. A. Nelson, B. E. Williamson. «Low-Temperature Laser Raman Spectroscopy of Synthetic Carbonated Apatites and Dental Enamel.» (Journal of Chemistry) 35, nº 715-27 (1982).
- D. Gopi, J. Indira, L. Kavitha, M. Sekar, U. Kamachi Mudali. «Synthesis of hydroxiapatite nanoparticles by ultrasonic assisted with , mixed hollow sphere template method.» *Elsevier* 93 (2012): 131-134.

- D. Gopi, K. M. Govindaraju, C. A. Prakash Victor, L. Kavitha, N. Rajendiran. «Spectroscopic investigation of nanohydroxyapatite powders synthesized by conventional and ultrasonic couple sol-gel routs.» *Elsevier Spectrochimica Acta Part A* 70 (2008): 1243-1245.
- De Pavía-Mota E., Larios-González M.G., Criceño-Cortés G. «Manejo de Osteoartritis en Medicina Familiar y Ortopedia.» (Archivos en Medicina Familiar) 7(3), nº 93-98 (2005).
- E. Birmingham, G.L. Niebur, P.E. McHugh, G. Shaw, F.P. Barry, L.M. McNamara. «Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regurated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone nich.» (European Cells and Materials) 23, nº 13-27 (2012).
- Elliot, J. C. «Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates.» (Studies in Inorganic Chemistry Elsevier) 18, nº 112-115 (1994).
- Ewing, Galen W. *Instrumental Methods of Chemical Analysis*. USA: McGraw-Hill, Inc., 1985.
- F. Castro, S. Kuhn, K. Jensen, A. Ferreira, F. Rocha, A. Vicente, J. António Teixeira. «Process intensification and optimization for hydroxyapatite nanoparticles production.» *Chemical Engineering Science* 100 (2013): 352-359.
- F. M. Nelsen, F. T. Eggertsen. «Determination of Surface Area.» (Shell Development Co.) 30, nº 8 (1958).
- F. Nagata, Y. Yamauchi, M. Tomita, K. Kato. «Hydrothermal Synthesis of hydroxyapatite nanoparticles and their protein adsorption behavior.» *Ceramic Society of Japan* 121, nº 9 (2013): 797-801.
- G. Balasundaram, M. Sato, T. J. Webster. «Using hydroxyapatite nanoparticles and decrease crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD.» (ELSEVIER Biomaterials) 27, nº 2798 - 2805 (2006).
- G. C. Koumoulidis, T. C. Vaimakis, A. T. Sdoukos. «Preparation of Hydroxyapatite Lathlike Particles Using High-Speed Dispersing Equipment .» (J. Am. Ceram. Soc. ) 84 (6) , nº 1203-1208 (2001).
- G. Lehmann, I. Cacciotti, P. Palmero, L. Montanaro, A. Bianco, L. Campagnolo, A. Camaioni. «Differentiation of osteoblast and osteoclast precursor on pure and silicon-sustituted synthesized hydroxyapatite.» *IOP Science Biomedical Materials* 7 (2012): 13pp.

- H. Nagai, M. Kobayashi-Fujioka, K. Fujisawa, G. Ohe, N. Takamaru, K. Hara, D. Uchida, T. Tamatani, K. Ishikawa, Y. Miyamoto. «Effects of low crystalline carbonate apatite on proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow cells.» (J. Mater Sci: Mater Med) DOI 10.1007/S10856-015-5431-5, nº 26:99 (2015).
- H. S. Liu, T. S. Chin, L.S. Lai S. Y. Chiu, K. H. Chung, C. S. Chang, M. T. Lui. «Hydroxyapatite Synthesized by a Simplified Hydrothermal Method.» *Ceramics International* 23 (1997): 19-25.
- H. Wang, S. Zhu, L. Wang, Y. Feng, X. Ma, S. Guan. «Formation mechanism of Ca-deficient hydroxyapatite coating on Mg-Zn-Ca alloy for orthopedic implant.» (ELSEVIER Applied Surface Science ) 307, nº 92-100 (2014).
- Hoeman C. D., El-Gabalaw, M.D. McKee. «In vitro osteogenesis assay: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization.» (Elsevier Masson) 57, nº 318 - 323 (2009).
- I. A. Figueroa, O. Novelo-Peralta, C. Flores-Morales, R. González-Tenorio, M. C. Piña-Barba. «Synthesis and characterization of biocompatible-nanohydroapatite crystals obtained by modified sol-gel processing.» (Biomatter 2) 2, nº 71-76 (2012).
- I. R. Gibson, W. Bonfield. «Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite.» (IRC in Biomedical Materials) 2001.
- J. M. Hughes, M. Cameron, K. D. Crowley. «Structural variations in natural F, OH and Cl apatites.» 74, nº 870-876 (1989).
- J. Wang, L. L. Shaw. «Synthesis of high purity hydroxyapatite nanopowder via sol-gel combustion process.» *Material Science Mater Med*, 2009: 1223-1227.
- Joyce Y Wong, Joseph D. Bronzino, Donald R. Peterson. *Biomaterials Principles and Practices*. CRM Press Taylor and Francis, 2013.
- K. Ishikawa, P. Ducheyne, S. Radin. «Determination of the Ca/P ratio in calcium deficient hydroxyapatite using X-ray diffraction analysis.» (Journal of material science materials in medicine) 4, nº 165-168 (1993).
- K. Lin, X. Liu, J. Chang, Y. Zhu. «Facile synthesis of hydroxyapatite nanoparticle and hollow nano-structured microspheres using similar structured hard precursors.» *Nanoscale* 3 (2011): 3052.
- K. Worley, A. Certo, L. Q. Wan. «Geometry-Force Control of Stem Cell Fate.» (BioNanoSci.) DOI 10.1007/s12668-012-0067-0 (2012).

- L. B. Kong, J. MA, F. Boey. «Nanosized hydroxyapatite powders derived from coprecipitation process.» *Material Science* 37 (2002): 1131-1134.
- L. L. Hench, J. M. Polak. «Third-generation biomedical material.» *Science* 295 (2002): 1014-7.
- López, P. D. U. Avendaño. «Efecto de la adición de iones dopantes de magnesio y estroncio a partir de diferentes sales precursoras en la hidroxiapatita.» nº 6-8. 2012.
- M. A. Giardina, M. A. Fanovich. «Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from Ca(OH)<sub>2</sub> and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> assisted by ultrasonic irradiation.» *Ceramics International* 36 (2010): 1961-1969.
- M. A. Martins, C. Santos, M. M. Almeida, M. E. V. Costa. «Hydroxyapatite micro- and nanoparticles: Nucleation and growth mechanisms in the presence of citrate species.» (*Elsevier Journal of Colloid Interface Science* ) 318, nº 210-216 (2008).
- M. de Campos, F. A. Müller, A. H. A. Bressiani, J. C. Bressiani, B. Greil. «Sonochemical synthesis of calcium phosphate powders.» *Material Science Mater Med* 18 (2007): 669-675.
- M. de Campos, F. A. Müller, A. H. A. Bressiani, J.C. Bressiani, P. Greil. «Sonochemical synthesis of calcium phosphate powders.» *Journal of Material Science: Materials in Medicine* 18 (2007): 2731-2743.
- M. E Marsh, A. M. Munne, J. J. Vogel, Y Cui, R. T. Franceschi. «Mineralization of bone-like extracellular matrix in the absence of functional osteoblasts.» (*Journal of Bone and Mineral Research*) 10, nº 11 (1995).
- M. Iafisco, J. M. Delgado-López. *Apatite: synthesis, structural characterization, and biomedical applications*. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2014.
- M. Jaffe, W. Hammond, P. Tolia, T. Arinze. *Characterization of biomaterials*. Woodhead Publishing Series in Biomaterials, 2013.
- M. Manda-Guiba, I. Stasinopoulou, D. Christofilos. «Behind Apatite Formation: An Attempt at Conceptualizing Nature.» (NOVA Science), nº 81-94 (2014).
- M. Mathew, S. Takagi. «Structures of Biological Minerals in Dental Research.» (*Journal of Research of National Institute of Standards and Technology* ) 106, nº 6 (2001).

- M. Mohebbali, A. Shokuhfar,. «Sonochemical Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanoparticles.» *Advanced Materials and Nanotechnology* 312-315 (2011): 423-426.
- M. Muñoz Gómez, J.J. Garcí Vallejo, A. López-Andrade Jurado, A. Gómez Luque, M.D. Ruiz Romero de la Cruz, J. Maldonado Eloy-García. «Autotransfusión postoperatoria, en cirugía ortopédica.» (*Anestesiol*) 48, nº 131-140 (2001).
- M. N. Salimi, A. Anuar. «Characterization of Biocompatible And Bioactive Hydroxyapatite Particles.» (*Elsevier Procedia Engineering* ) 53, nº 192-196 (2013).
- M. Nabil Salimi, R. H. Bridson, L. M. Grover, G. A. Leeke. «Effect of processing conditions on the formation of hydroxyapatite nanoparticles.» *Powder Technology* 218 (2012): 109-118.
- M. Sadat-Shojai. «Preparation of Hydroxyapatite Nanoparticles: Comparison between Hydrothermal and Solvo-Treatment Processes and Colloidal Stability of Produced Nanoparticles in Diluted Experimental Dental Adhesive.» *Journal of Iranian Chemical Society* 6, nº 2 (2009): 386-392.
- M. Sadat-Shojai, Mohammad-Taghi Khorasani, A. Jamshidi. «Hydrothermal processing of hydroxyapatite nanoparticles-A Taguchi experimental design approach.» *Crystal Growth* 361 (2012): 73-84.
- M. Sdat-Shojai, Mohammad-Taghi K., E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi. «Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures.» *Elsevier Acta Biomaterialia* 9 (2013): 7591-7621.
- M. Vallet Regí, E. Ruíz Hernández. «Bioceramics: From Bone Regeneration to Cancer Nanomedicine.» (*Advanced Materials*) 23, nº 5177-5218 (2011).
- M. Vallet-Regí, L. M. Rodríguez-Lorenzo, A. J. Salinas. «Synthesis and characterization of calcium deficient apatite.» (*ELSEVIER Solid State Ionics* ) 101-103, nº 1279 - 1285 (1997).
- M.P. Mahabole, R. C. Aiyer, C. V. Ramakrishna, B. Sreedhar, R. S. Khairnar. «Synthesis, characterization and gas sensing property of hydroxyapatite ceramic .» *Indian Academy of Science Bull Material Science* 28, nº 6 (2005): 532-545.
- Michele Iafico, José Manuel Delgado-López. *Apatite, Synthesis, Structural Characterization and Biomedical Applications*. ANOVA, 2014.

- Miguel José Yacamán, José Reyes Gasga. *Microscopía Electrónica Una visión del microcosmos*. México. D. F.: Fondo de Cultura Económico, 1995.
- N. Vargas Becerril, C. Patiño Carachure, L. M. Rodríguez-Lorenzo, L. Téllez Jurado. «Synthesis of hybrid compounds apatite-alendronate by reactive milling and effects on structure and morphology of apatite phase.» *Elsevier Ceramic International* 39 (2013): 3921-3929.
- Niinomi, M. «Recent Metallic Materials for Biomedical Applications .» (Metallurgical and Materials Transactions A) 33A, nº 477 (2002).
- P. Frayssinet, F. Tourenne, N. Rouquet, P. Conte, C. Delgado, G. Bonel. «Copartive biological properties of HA plasma-sprayed coating having different crystallinities.» (Journal of Material Science) 5, nº 11-17 (1994).
- Q. Chen, G. A. Thouas. «Metallic Implant biomaterials.» (ELSEVIER Material Science and Engineering R) R 87, nº 1-57 (2015).
- R. Astala, M. J. Stott. «First Principles Investigation of Mineral Component of Bone: CO<sub>3</sub> Substitutions in Hydroxyapatite.» (Chem Mater) 17, nº 4125-4133 (2005).
- R. Barabás, M. Czikó, I. Dékány, L. Bizo, E. S. Bogyá. «Comparative study of particle size analysis of hydroxyapatite-based nanomaterials.» (VERSITA Chemical Papers) 67, nº 1414-1423 (2013).
- R. Murugan, S. Ramakrishna, K. Pandranga Rao. «Nanoporous hydroxy-carbonate apatite acaffold made of natural bone.» (Materials Letters ) 60, nº 2844-2847 (2006).
- Regí, M. Vallet. «Evolution of bioceramics within the field of biomaterials.» (C.R. Chimie) 13, nº 174-185 (2010).
- Rustum R. Dinesh K. A., V. Srikanth. «Acoustic wave simulation of low temperature ceramic reactions: The system Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-H<sub>2</sub>O.» (Journal of Materials) 6, nº 11 (1991).
- S. H. Zhu, B. Y. Huang, K. C. Zhou, S. P. Huang, F. Liu, Y. M. Li, Z. G. Xue, Z. G. Long. «Hydroxyapatite nanoparticles as a novel gene carrier.» *Nanoparticle Research* 6 (2004): 307-311.
- S. Inthong, T. Tunkasiri, S. Eitssayeam, K. Pengpat, G. Rujjanagul. «Physical properties and bioactivity of nanocrystalline hydroxyapatite synthesized by co-precipitation route.» *Elsevier Ceramics International* 39 (2013): S533-S536.

- S. M. Best, A. E. Porter, E. S. Thian, J. Huang. «Bioceramics: Past, present and future.» 28, nº 1319-1327 (2008).
- S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, K. W. Leong. «Biomedical applications of polymer-composite materials: a review.» (Elsevier Composites Science and Technology) 61, nº 1189-1224 (2001).
- S. Salmasi, D. M. Kalaskar, W. W. Yoon, G. W. Blunn, A. M. Seifalian. «Role of nanotopography in the development of tissue engineered 3D organs and tissue using mesenchymal stem cells.» (World Journal of Stem Cells) 7, nº 2 (2015).
- Sheehan, David. *PHYSICAL BIOCHEMISTRY: PRINCIPLES AND APPLICATIONS*. London: John Wiley and Sons Ltd., 2000.
- Singh S. S., Abhijit R. , Boeun E. L., Ipsita B., Prashant N. K. «MC3T3 E1 proliferation and differentiation on biphasic mixtures of Mg substituted B tricalcium phosphate and amorphous calcium phosphate.» (Material Science and Engineering C) 45, nº 589 - 598 (2014).
- T. M. Sridhar, T.K. Erumugam, S. Rajeswari, M. Subbaiyan. «Electrochemical behavior of hydroxyapatite-coated stainless steel implants.» *Material Science Letters* 16 (1997): 1964-1966.
- T.J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Siegel, R. Bizios. «Enhance functions of osteoblasts on nanophase ceramics .» (Elsevier Biomaterials) 21, nº 1803-1810 (2000).
- V. Dhand, K. Y. Rhee, Soo-Jin Park. «The facile and low temperature synthesis of nanophase hydroxyapatite crystal using wet chemistry.» *Material Science and Engineering C36* (2014): 152-159.
- V. Dhand, K.Y. Rhee, Soo-Jin Park. «The facile and low temperature synthesis of nanophase hydroxyapatite crystals using wet chemistry.» (Material Science and Engineering C) 36, nº 152-159 (2014).
- Vargas, N. Becerril. *Estudio en las características estructurales del compuesto HA-BP obtenido por síntesis química y molienda reactiva*. Abril 2003.
- W. Bing Tien, M. Tsao Chen, P. Chuan Yao. «Effects of pH and temperature of hydroxyapatite / collagen composites synthesized in vitro.» (ELSEVIER Material Science and Engineering ) 32 C (2012).

- W. Bing Tien, M. Tsao Chen, P. Chuan Yao. «Effects of pH and temperature of hydroxyapatite / collagen composites synthesized in vitro.» *Elsevier Material Science and engineering C*, n° 32 (2012): 2096-2102.
- W. Kim, F. Saito. «Sonochemical synthesis of hydroxyapatite from H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution with Ca(OH)<sub>2</sub>.» (*Elsevier Ultrasonic Sonochemistry*) 8, n° 85-88 (2001).
- W. Kim, F. Saito. «Sonochemical synthesis of hydroxyapatite from H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution with Ca(OH)<sub>2</sub> .» *Ultrasonics Sonochemistry* 8 (2001): 85-88.
- William D. Callister, Jr., David G. Rethwisch. *Materials Science and Engineering An Introduction*. John Wiley and Son's, Inc., 2007.
- Williams, D. F. «On the nature of biomaterials.» 30, n° 5897-5909 (2009).
- X. Gou, J. E. Gough, P. Xia, J. Liu, Z. Shen. «Fabrication of nanostructured hydroxyapatite and analysis of human osteoblastic cellular response.» *Biomedical Materials Research Part A* , 2007.
- X. Guo, J. E. Gough, P. Xiao, J. Liu, Z. Shen. «Fabrication of nanostructured hydroxyapatite and analysis of human osteoblastic cellular response.» (*Wiley Inter Science* ) DOI: 10.1002/jbm.a.31200 (2006).
- X. Guo, P. Xiao. «Effects of solvents on properties of nanocrystalline hydroxyapatite produced from hydrothermal process.» (*Elsevier Journal of European Ceramic Society* ) 26, n° 3383-3391 (2006).
- X. Guo, P. Xiao. «Fabrication of Nanostructured Hydroxyapatite via Hydrothermal Synthesis and Spark Plasma Sintering.» *American Ceramic Society* 4, n° 88 (2005): 1026-1029.
- Y. Han, X. Wang, S. Li. «A simple route to prepare stable hydroxyapatite nanoparticles suspension.» (*Journal Nanopart Res*) 11, n° 1235-1240 (2009).
- Y. Li, W. Weng, K. Chiutam. «Novel highly biodegradable biphasic tricalcium phosphate composed of alpha tricalcium phosphate and beta tricalcium phosphate.» 3 (2007): 251-254.
- Y. Sun, T. Fan, Chang-an Wang, L. Ma, F. Liu. «Template induced synthesis of nano hydroxyapatite by co-precipitation method.» *Advanced Materials Research* 311-313 (2011): 1713-1716.

- Y. Sun, Y. Deng, Z. Ye, S. Liang, Z. Tang, S. Wei. «Peptide Decorated nano-hydroxyapatite with enhance bioactive and osteogenic differentiation via polydopamine coating.» *Elsevier Colloids and Surface B: Biointerfaces* 111, 2013: 107-116.
- Y. Yuan, C. Liu, Y. Zhang, X. Shan. «Sol-gel auto-combustion synthesis of hydroxyapatite nanotubes array in porous alumina template.» (*ELSEVIER Materials Chemistry and Physics*) 112, nº 275-280 (2008).
- Y. Zhao, Y. Zhang, F. Ning, D. Guo, Z. Xu. «Synthesis and cellular biocompatibility of two kinds of HAP with different nanocrystal morphology.» (*Journal of Biomaterials Research*) DOI: 10.1002/jbm.b.30774 (2006).
- Z. Z. Zyman, D. V. Rokhmistrov, V. I. Glushko, I. G. Ivanov. «Thermal impurity reactions and structural changes in slightly carbonated hydroxyapatite.» *J. Mater. Sci.* , 2009: 20:1389-1399.
- Z. Zou, K. Lin, L. Chen, J. Chang. «Ultrafast synthesis and characterization of carbonated hydroxyapatite nanopowders via sonochemistry-assisted microwave process.» *Elsevier Ultrasonics Sonochemistry* 19 (2012): 1174-1179.
- Zachariadis, George A. *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry A Model Multi-Elemental Technique for Modern Analytical Laboratory*. New York: Nova Science, 2012.