



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA Y B-FOSFATO TRICÁLCICO, EN LA
ELABORACIÓN DE BIOMATERIALES, CON ÁCIDO POLILÁCTICO, POR
IMPRESIÓN 3D PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA

PRESENTA

ANA BELEN REYES SANTOYO

TUTOR DE TESIS

MARÍA DE LOURDES CHÁVEZ GARCÍA



Ciudad Universitaria, CD. MX., 2019



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **María de Lourdes Chávez García**

VOCAL: **Margarita Chávez Martínez**

SECRETARIO: **Filiberto Rivera Torres**

1er. SUPLENTE: **José Martín Enrique Carreto Cortés**

2° SUPLENTE: **Tania Ariadna García Mejía**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE CERÁMICA, EDIFICIO B, 4TO PISO. FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. MA. DE LOURDES CHÁVEZ GARCÍA

M. EN C. DIANA ELIZABETH JUÁREZ ROBLES

SUSTENTANTE:

ANA BELEN REYES SANTOYO

**“NUESTRAS VIRTUDES Y NUESTROS DEFECTOS SON
INSEPARABLES COMO LA FUERZA Y LA MATERIA. CUANDO SE
SEPARAN, EL HOMBRE DEJA DE EXISTIR”**

Nikola Tesla

Los resultados del trabajo de tesis se presentaron en:

- ✚ El IV Congreso Internacional de Docencia e Investigación en Química, IV CIDIQ, con el nombre de **“Estudio de las condiciones para la síntesis de la hidroxiapatita y el β -fosfato tricálcico”** modalidad cartel, Septiembre, 2018.
- ✚ El X Congreso Internacional de Docencia e Investigación en Química, V CIDIQ, con el nombre de **“Síntesis por coprecipitación del bifosfato de calcio con base en hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico”**, modalidad oral, Septiembre, 2019.

AGRADECIMIENTOS

A la **Facultad de Química**, UNAM, por el financiamiento del Proyecto **5000-9038**, **PAIP**, para el desarrollo del proyecto presente.

A la beca otorgada por la **Facultad de Química**, UNAM, a través del Departamento de Superación Académica, mediante el **Subprograma 127** “Formación Básica en Investigación”.

ÍNDICE

Glosario	4
Índice de figuras	5
Índice de tablas	7
Resumen	8
Introducción	9
1. Marco teórico	12
1.1 Ingeniería de tejidos	12
1.2 Biomateriales	13
<i>1.2.1 Metálicos</i>	14
<i>1.2.2 Poliméricos</i>	15
1.2.2.1 Ácido poliláctico, PLA.....	16
1.2.3 <i>Cerámicos</i>	17
1.2.3.1 Fosfatos de calcio	17
1.2.3.1.1 Hidroxiapatita, HAP	18
1.2.3.1.2 Beta fosfato tricálcico, β -TCP	19
1.2.3.1.3 Bifosfato de calcio BCP	20
1.2.3.2 Obtención de BCP	22
1.2.4 <i>Materiales compuestos</i>	24
1.2.4.1 Hueso	25
1.2.4.2 Incorporación de materiales compuestos para la sustitución de tejido óseo	26

2. Objetivos	29
2.1 Objetivo general	29
2.2 Objetivos específicos	29
2.3 Hipótesis	29
3. Desarrollo experimental	30
3.1 Reactivos	30
3.2 Equipo	30
3.3 Caracterización	30
3.3.1 Difracción de rayos X de polvos (DRX):	30
3.3.1.1 Tamaño de partícula.....	31
3.3.2 <i>Espectroscopía de absorción infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)</i>	31
3.3.3 <i>Microscopía óptica</i>	31
3.3.4 <i>Microscopía electrónica de barrido (MEB)</i>	31
3.3.5 <i>Ensayo de compresión</i>	31
3.4 Procedimiento experimental	31
3.4.1 <i>Síntesis del biocerámico</i>	32
3.4.2 <i>Integración cerámico/polímero</i>	33
3.4.2.1 <i>Extrusión</i>	34
3.4.3 <i>Impresión 3D</i>	34
3.4.3.1 <i>Pruebas mecánicas de compresión</i>	35
3.4.3.2 <i>Fluido corporal simulado, FCS</i>	35
4. Resultados	36
4.1 Síntesis del cerámico BCP	36
4.1.1 <i>DRX y tamaño de partícula</i>	36
4.1.2 <i>FT-IR</i>	37
4.1.3 <i>MEB</i>	38
4.2 Material compuesto: BCP/PLAproporción 10/90 %m/m	39
4.2.1 <i>Microscopía óptica</i>	39

4.2.2 FT-IR.....	40
4.2.3 MEB.....	41
4.2.4 Extrusión del BCP/PLA.....	43
4.2.4.1 Microscopía óptica	43
4.2.4.2 FT-IR	43
4.2.4.3 MEB.....	44
4.3 Impresión 3D.....	46
4.3.1 Microscopía óptica	46
4.3.2 Ensayo de compresión.....	46
4.3.3 MEB.....	47
4.3.4. Pruebas FCS.....	49
4.3.4.1 FT-IR	49
5. Discusión de resultados	51
6. Conclusiones.....	58
Anexos	60
I. Síntesis preliminares de BCP.....	60
II. Reactivos utilizadas en el FCS.....	61
III. Proporciones obtenidas	61
IV. Productos académicos.....	65
Referencias.....	79

GLOSARIO

Bioactividad: facultad de estimular las respuestas celulares de un implante en la región tratada (Martin y Martin, 2019; Eliaz y Metoki, 2017).

Biocompatibilidad: capacidad de un biomaterial para integrarse en el tejido huésped, para realizar su función sin provocar respuesta inmune (Martin y Martin, 2019; Bittner et al., 2019).

Biodegradabilidad: es la degradación de un material a partir de un agente biológico (Martin y Martin, 2019; Ducheyne et al., 2015).

Biomaterial: sustancia inerte, implantada o incorporada dentro de un sistema vivo (Timofejeva et al., 2017).

Osteoblastos: células del hueso encargadas de la formación ósea (Minte et al., 2019; Florencio et al., 2015).

Osteocitos: células que se encargan de la formación y resorción ósea (Minte et al., 2019).

Osteoclastos: célula que degrada, reabsorbe y remodela hueso (Florencio et al., 2015).

Osteoinductividad: propiedad de atraer células a la región del defecto y promover su maduración (Martin y Martin, 2019).

Osteointegración: crecimiento óseo extensivo en los poros del tejido (Martin y Martin, 2019).

Osteón: se aplica a la unidad funcional y estructural de hueso compacto, también llamado sistema de Havers (Gong et al., 2015).

Termoplasticidad: propiedad de los polímeros de deformarse sin rotura, con temperatura (Chia y Wu, 2015).

Vascularización: conjunto y riego de los pequeños vasos sanguíneos y linfáticos en un tejido, órgano o región del organismo (Gong et al., 2015).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del PLA.....	16
Figura 2. a) Estructura de la HAP; b) coordinación del calcio 1, Ca(1); c) coordinación del calcio 2, Ca(2) (Lin et al., 2015).	19
Figura 3. a) Estructura del β -TCP vista a lo largo de [0001], b) y c) indican las configuraciones de los grupos CaO_n y PO_4 en las columnas b y c (Yashima et al., 2003).	20
Figura 4. Materiales compuestos.....	24
Figura 5. Metodología para la síntesis de BCP por el método de coprecipitación.	32
Figura 6. Conformación del material compuesto BCP/PLA por el método de emulsión doble.	33
Figura 7. Extrusión del material BCP/PLA.....	34
Figura 8. Impresión de andamios de BCP/PLA.	34
Figura 9. Probeta de compresión para el BCP/PLA.	35
Figura 10. Difractograma de RX, del BCP sintético.....	37
Figura 11. Espectro de IR del BCP obtenido.	38
Figura 12. Micrografía de BCP a) aglomerados de BCP, b) morfología y composición de los aglomerados.	39
Figura 13. Material BCP/PLA por microscopía óptica 2x.	40
Figura 14. Comparación de IR del BCP/PLA con las materias de los precursores.	41
Figura 15. Micrografía del material compuesto BCP/PLA.	42
Figura 16. MEB a) Sección de la muestra BCP/PLA para el mapeo, b) Mapeo de la muestra BCP.	42
Figura 17. Filamento del BCP/PLA obtenido por extrusión en microscopía óptica 2x.	43

Figura 18. Espectro IR del filamento del BCP/PLA obtenido por extrusión comparado con los precursores.	44
Figura 19. Filamento del BCP/PLA por MEB.	45
Figura 20. MEB a) Superficie del filamento del BCP/PLA obtenido por extrusión, b) mapeo de la superficie de a.	45
Figura 21. Impresión 3D del material BCP/PLA vista en microscopia óptica 2x. ...	46
Figura 22. Probeta de BCP/PLA, en el ensayo de compresión.	47
Figura 23. MEB del Enrejado del andamio a) al imprimir, b) con ensayo de compresión.	48
Figura 24. MEB de a) Línea de construcción del BCP/PLA de la probeta después del ensayo de compresión, b) aumento de la fractura de a, c) mapeo de la fractura en b, para detectar la presencia de elementos en la periferia de la fractura demostrada en 24b.	48
Figura 25. Andamio húmedo con el FCS.	49
Figura 26. Seguimiento del material BCP/PLA por FT-IR.	50
Figura 27. Proporción de la HAP y del β -TCP en función del pH.	52
Figura 28. Gráficas de las proporciones del BCP respecto a la temperatura a) de la HAP y b) del β -TCP.	53
Figura 29. Tamaño de partícula de HAP y β -TCP, en función del tiempo de cristalización.	54
Figura 30. Patrones de DRX del BCP con las siguientes proporciones de HAP y β -TCP respectivamente a) 50/50, b) 60/40, c) 70/30, d) 80/20 y e) 90/10 sintetizado por coprecipitación.	62
Figura 31. Espectros de infrarrojo de BCP con base en HAP y β -TCP respectivamente a) 50/50, b) 60/40, c) 70/30, d) 80/20 y e) 90/10.	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales poliméricos usados en ingeniería de tejido óseo.	15
Tabla 2. Propiedades del PLA (Andrew 2012; Carrasco et al., 2010; Russias et al., 2007).	16
Tabla 3. Especies de fosfato de calcio (Eliaz y Metoki, 2017; Lee et al., 2016).	18
Tabla 4. Propiedades mecánicas de HAP y β -TCP (Eliaz y Metoki, 2017).	22
Tabla 5. Propiedades mecánicas del hueso (Monmaturapoj et al., 2017; Roohani et al., 2016; Rho et al., 1993).	26
Tabla 6. Condiciones de síntesis preliminares.	60
Tabla 7. Orden y cantidades de reactivos utilizadas en el FCS (Kokubo y Takadama, 2006; Segura et al., 2018).	61
Tabla 8. Proporciones del BCP.	61
Tabla 9. Tamaño de partícula del BCP en función de su proporción HAP/ β -TCP.	63
Tabla 10. Proporciones obtenidas en las síntesis preliminares.	65

RESUMEN

La finalidad del trabajo fue desarrollar la metodología para la síntesis, la conformación y la impresión 3D de andamios, para emular las características del hueso, en la formación de biomateriales de regeneración ósea biocompatibles y bioactivos a partir, de la conformación del material compuesto de bifosfato de calcio (BCP) y ácido poliláctico (PLA) en proporción 10/90 %m/m respectivamente.

La síntesis de los andamios de BCP, con base en hidroxiapatita, HAP, y β -fosfato tricálcico, β -TCP, en una proporción 70/30 respectivamente, se realizó por el método de coprecipitación, por medio del estudio de las condiciones de la síntesis, con variación de los parámetros siguientes: el pH, temperatura y el tiempo de cristalización. La integración del biomaterial compuesto del BCP/PLA, se obtuvo por el método de emulsión sólido-aceite-agua, para la extrusión del filamento y la conformación del andamio, por impresión 3D. Los resultados mostraron la obtención de HAP/ β -TCP en proporción 70/30, lo que corroboró DRX y FT-IR. El pH de la síntesis y la temperatura de cristalización influyeron en la proporción de las fases; mientras el tiempo de cristalización, en el tamaño de partícula. En cuanto al material compuesto de BCP/PLA, 10/90, resultó una dispersión del BCP en la matriz polimérica, con la formación de microesferas de acuerdo a MEB, lo que permitió la obtención de un filamento homogéneo, apto para la elaboración de probetas por impresión 3D, conservando la misma composición química en todo el proceso.

El BCP se sintetizó a un pH de 9 y temperatura de cristalización de 750 °C por 2 h, el cual se obtuvo con 99 % de pureza y tamaño de partícula menor a 60 nm, debido a estas características del cerámico se obtuvieron las microesferas con PLA de tamaño menor a las 10 μ m. La resistencia a la compresión final de la probeta de BCP/PLA fue de 27.46 MPa, comparable con la del hueso esponjoso. La homogeneidad de la cerámica en el polímero y la forma del espécimen aseguran las propiedades de biocompatibilidad y bioactividad, del andamio para su uso como prospecto de biomaterial para la regeneración ósea.

INTRODUCCIÓN

La demanda del reemplazo de tejidos y órganos perdidos o dañados no se satisface con el trasplante de donantes, debido a la falta de tejidos inmunológicamente compatibles (Bao et al., 2019). Todo tipo de traumatismos provoca daños y degeneración, no reversibles, en los tejidos del cuerpo humano, lo que requiere tratamientos médicos y quirúrgicos que hagan posible su reparación, reemplazo o regeneración (Martin y Martin, 2019).

En el caso del tejido óseo, las enfermedades que le afectan son frecuentes, como son las fracturas, los tumores, la osteoporosis, las infecciones y las enfermedades reumáticas, las cuales producen lesiones irreversibles provocando una regeneración ósea escasa (Martin y Martin, 2019; Timofejeva et al., 2017).

El tejido óseo es el segundo más trasplantado en todo el mundo, con al menos cuatro millones de operaciones anuales de injertos o sustitutos (Martin y Martin, 2019), por ello la necesidad de generar sustitutos para los tejidos naturales degenerados o dañados, por lo que son objeto de estudio de la ingeniería de tejidos (Pina et al., 2015), la cual tiene el desafío de diseñar métodos funcionales para crear tejidos artificiales, capaces de imitar las características estructurales y mecánicas de los tejidos nativos (Martin y Martin, 2019; Bittner et al., 2019).

La investigación de materiales está influenciada por el desarrollo de tecnologías avanzadas en la ingeniería de tejidos, como la impresión 3D, para la formación de andamios tridimensionales, que cuenten con las características de biocompatibilidad y la biodegradabilidad, es decir que se integren con el tejido naciente para evitar la degeneración o deformación del tejido anfitrión y, mantener la función de soporte de carga durante la remodelación ósea (Bittner et al., 2019; Ho et al., 2016).

Los biomateriales son definidos como sustancias inertes, implantadas o incorporadas dentro de un sistema vivo, como la piel, los huesos, y los ligamentos, entre otros (Narayanan et al., 2016). Se caracterizan por sus propiedades físicas, mecánicas, químicas y biológicas (Timofejeva et al., 2017); para ello, la biocompatibilidad y la bioactividad son requisitos fundamentales; debido a la necesidad de un material amigable, con el cuerpo y que interactúe químicamente, con la actividad fisiológica del organismo para el beneficio de la salud de las personas (Eliaz y Metoki, 2017).

La sustitución o regeneración de defectos óseos se ha simulado con biomateriales cerámicos como son los fosfatos de calcio, debido a su parecido estructural a la composición inorgánica del hueso, en los que destaca la mezcla del bifosfato de calcio, BCP, con base en hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico, estos materiales son inertes, rígidos, con propiedades mecánicas escasas, lo que limita su uso como sustituto en el organismo (Timofejeva et al., 2017); aunado a esto, la investigación de andamios mezclados de HAP/ β -TCP es escasa (Ho et al., 2016; Torres et al., 2013)

Las proporciones del BCP, de 70/30 de hidroxiapatita/ β -fosfato tricálcico, son de interés debido a que la hidroxiapatita se encuentra en una cantidad mayor en el organismo, respecto a otros fosfatos de calcio. Las propiedades del BCP son: tamaño de partícula de 20 a 60 nm y pureza mayor al 99 %, las cuales se desarrollan en función del método de obtención empleado. La síntesis por coprecipitación ha mostrado ser más eficaz que, los métodos cerámicos, sol-gel, combustión, entre otros; por la sencillez de síntesis, procesamiento y desarrollo de las propiedades mecánicas y de estabilidad química, así como para el control del tamaño de partícula (Eliaz y Metoki, 2017).

Las biocerámicas se integran, con los polímeros en la reducción de su fragilidad y el aumento de las propiedades mecánicas (Torres et al., 2013). El ácido poliláctico, PLA, es uno de los polímeros empleados en la conformación de materiales compuestos; biocompatible con el organismo, junto con el biocerámico BCP, en proporción 10/90 %m/m. Estos materiales compuestos de

cerámica/polímero son considerados alternativos para la sustitución de tejido duro, como auxiliares en la reparación y la regeneración ósea por sus propiedades mecánicas y una osteointegración semejante a la composición de los huesos (Kaavessina et al., 2015; Fang et al., 2019).

La metodología propuesta para la integración de materiales compuestos, es la de emulsiones dobles del tipo sólido/aceite/agua. El cual es un método eficiente, en donde el cerámico se dispersa de forma homogénea en el polímero; que conserva y beneficia las propiedades mecánicas del material y genera osteointegración, por lo que se considera un candidato prometedor para la reparación y regeneración ósea (Fang et al., 2019; Watering et al., 2017; Juárez et al., 2017).

Los biomateriales compuestos usados para la regeneración ósea, del tipo cerámico/polímero son bioactivos y degradables en el organismo en el cual se implantan; para conformarse en andamios, producidos con tecnologías de fabricación aditiva, como la impresión 3D. Esta tecnología es prometedora en la aplicación clínica, debido a que es simple, rentable, reproducible y de arquitectura modificable (Torres et al., 2013).

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un campo de investigación multidisciplinario que combina principios de química, biología, e ingeniería para el desarrollo de tejidos y órganos. Por ello, promueve el diseño de andamios combinados con células para la sustitución total de órganos o la regeneración de tejidos (Pina et al., 2015). El andamio provee una estructura en donde las células se infiltren y proliferen en la matriz extracelular, a partir de un modelado bioquímico y físico que genera conexiones con el tejido insertado (Sobczak et al., 2017).

La arquitectura del andamio está compuesta por tres estructuras: la macro, es la forma general del dispositivo, el cual depende del paciente y el órgano o tejido a reemplazar; la micro se refiere a la forma, el tamaño y la interconexión de los poros en donde se realizan la penetración celular y el crecimiento vascular (Gong et al., 2015); y la nano es la composición elemental del material sustituto, parecida a la del tejido original, para propiciar la unión de biomoléculas que generen la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular (Sobczak et al., 2017; Chia y Wu, 2015).

La elaboración de andamios porosos para la ingeniería de tejidos se ha realizado a partir de métodos diferentes en los que se encuentran: la reproducción de espuma, electro hilado, secado en frío, impresión 3D, entre otras (Sobczak et al., 2017).

La impresión 3D es una técnica de fabricación de formas libres sólidas, con la capacidad de construir y diseñar topografías complicadas en materiales de naturaleza distinta, en la producción de prótesis, implantes y dispositivos de aplicación médica, con la ventaja de obtener andamios personalizados a partir de las tomografías de los pacientes (Poologasundarampillai y Nommeets, 2017; Cox et al., 2015).

La característica de esta tecnología es el diseño capa por capa, lo que controla la macro y la micro arquitectura del andamio debido a que es simple, rentable, reproducible y de arquitectura modificable. El diseño del andamio se crea a partir de un archivo con las especificaciones requeridas por el paciente, a través de un software, seguido de la fabricación del andamio. Las características de la impresión 3D, son: el equipo, el material de partida y los requisitos del andamio final (Chia y Wu, 2015; Torres et al., 2013).

La manufactura aditiva 3D comprende algunas de las técnicas siguientes, la sinterización selectiva por láser, la inyección de tinta, la estereolitografía, el modelado por deposición fundido, entre otros. El último método es destacado, por la formación de filamentos, a partir de un cabezal controlado, que mediante temperatura extruye de forma precisa un material termoplástico capa a capa sobre una plataforma de construcción (Chia y Wu, 2015; Jayachandran y Se, 2014).

Los andamios 3D son convenientes en la aplicación clínica, por tener la función de regenerar el tejido *in situ* mediante la estimulación del crecimiento de las células del tejido dañado, mediante fármacos, factores de crecimiento y biomateriales (Ochoa et al., 2015).

1.2 Biomateriales

La definición de biomaterial tiene dos acepciones, uno en el área legal y otro en la comunidad científica. El primero se relaciona, con un dispositivo médico destinado para el mantenimiento, de los seres humanos (Zadpoor, 2014; Trindade et al., 2016). Mientras que el segundo, se define como sustancia inerte, implantada o incorporada, que controla las interacciones con componentes de los sistemas vivos, para el reemplazo o regeneración en la función del tejido en contacto íntimo con él, ya sea de manera interna o externa (Pesenti et al., 2014).

Un biomaterial para ser insertado en el organismo, requiere que su diseño y desarrollo tenga las características específicas del tejido a reemplazar, es decir, si es blando como la piel o duro como el hueso (De la Peña y Miranda, 2016); con el fin de ser un soporte estructural para que residan las células y contribuya a sus propiedades mecánicas y químicas (Abraham, 2014).

Los biomateriales deben ser biocompatibles para inducir una respuesta apropiada del anfitrión en el medio del organismo vivo; sin toxicidad para evitar reacciones inflamatorias o alérgicas; bioactivos para favorecer la adhesión celular del implante con el tejido del sistema vivo (Chen et al., 2013; Sobczak et al., 2017); osteogénicos lo que implica el crecimiento y reparación del tejido; y osteoconductores relacionado al proceso, por el cual, el material inorgánico implantado, ofrece una matriz para el crecimiento de las células óseas (Chen et al., 2013,).

Los materiales empleados deben permitir la integración de un tejido tridimensional similar a la estructura anatómica que requiere regenerarse, con la capacidad de alojar y permitir el crecimiento, la reproducción y la renovación de las células, como lo hace de forma natural la matriz extracelular en los tejidos nativos, mediante señalizaciones intracelulares que inhiben o inducen funciones celulares específicas y a la vez ser biodegradables al ser eliminados por el metabolismo propio del tejido que lo alberga (Ochoa et al., 2015; Chen et al., 2013; Sobczak et al., 2017).

Los biomateriales se clasifican en metálicos, poliméricos, cerámicos y materiales compuestos.

1.2.1 Metálicos

Los biomateriales metálicos fueron los implantes usados en 1950, en la reconstrucción de tejidos duros, tales como la mandíbula, el cráneo, la cadera y las rodillas, debido a su dureza mayor a los 8 Mohs (Yi y Liu, 2017). Con ciertas desventajas: la primera ha sido el desgaste mayor en comparación, con el hueso en el organismo; mientras la segunda asociada a la formación y el

desprendimiento de los óxidos del metal, provocando inflamaciones y alergias. Los metales utilizados en la ingeniería de tejidos son el hierro, el magnesio, el cesio y el titanio (Tuj y Mohammad, 2014).

1.2.2 Poliméricos

Los biopolímeros son moléculas largas, compuestas de entidades estructurales, llamadas unidades de repetición, las cuales son duplicadas sucesivamente a lo largo de la cadena. Se clasifican en dos grupos, naturales y sintéticos. Los primeros están presentes en el organismo o bien en la naturaleza, mientras los segundos se han reproducido, por el ser humano, para usarse en tejidos suaves como la piel (Yi y Liu, 2017; Li et al., 2017).

Los biopolímeros son empleados para la ingeniería de tejidos, en la reconstrucción de andamios para tejido óseo, las ventajas y desventajas de su uso se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Materiales poliméricos usados en ingeniería de tejido óseo.

Material	Ventajas						Desventajas		
	Biocompatibilidad	Biodegradabilidad	Bioadsorbibilidad	Procesabilidad	Ductilidad	Elasticidad	Inflamación por productos de degradación	Colapso de andamio por degradación acelerada	No reemplazable en su totalidad por nuevo hueso
PLA	X	X					X		
PGA			X				X		
PLA-co-GA				X				X	
PPF					X			X	
PPS						X		X	
POE	X								X

PLA: ácido poliláctico; PGA: ácido poliglicólico; PLA-co-GA: ácido poliláctico copolimerizado con ácido poliglicólico; PPF: polipropileno fumarato; PPS: polipoliol sebacato; POE: poli-orto-éster (Roldán et al., 2016).

1.2.2.1 Ácido poliláctico, PLA

El PLA es un poliéster alifático, derivado de productos agrícolas de fácil disponibilidad comercial, es estudiado y utilizado para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas como tornillos para huesos y andamios para la ingeniería de tejidos, figura 1 (Roohani et al., 2016).

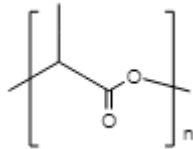


Figura 1. Estructura del PLA.

El PLA posee las características de biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas atractivas y termoplaticidad, las cuales proporcionan la manipulación y el soporte estructural temporal para la sustitución de tejido blando u órganos, tabla 2 (Lee et al., 2013).

Tabla 2. Propiedades del PLA (Andrew 2012; Carrasco et al., 2010; Russias et al., 2007).

Propiedades			
Temperatura (°C)		Mecánicas	
Transición vítrea, tg	60	Resistencia a la tensión (Mpa)	14-120
Fusión	153-180	Módulo de Young(Gpa)	2.7-3.8
Procesado	210-230	Alargamiento a la rotura (%)	4-7

La degradación del PLA en ácido láctico en el fluido corporal a 25 °C, es de aproximadamente 5 años, para optimizar el tiempo se realizan investigaciones del comportamiento del PLA en combinación con otros materiales para mejorar la eficiencia del biopolímero (Moataz et al., 2017).

1.2.3 Cerámicos

Los biocerámicos han reemplazado a los implantes metálicos, debido a que son inertes y no desprenden sustancias tóxicas en el organismo; por lo que se usan en el remplazo de tejidos duros y presentan características de bioactividad, biocompatibilidad, biodegradabilidad. Los biocerámicos se dividen en tres grupos representativos: a) los bioinertes, como la zirconia y la alúmina; b) los bioactivos, como es el caso del biovidrio, 45S5 (45% de silicio y 5% en relación molar de $\text{CaO/P}_2\text{O}_5$) y c) los bioadsorbibles entre los que destacan los fosfatos de calcio por su capacidad de regular las funciones celulares del hueso (Ducheyne et al., 2015).

1.2.3.1 Fosfatos de calcio

Los fosfatos de calcio, CPs, se utilizan como rellenos de huecos y para defectos óseos segmentarios sin carga, debido a sus características de manejo clínico y su capacidad para promover el crecimiento natural del hueso (Narayanan et al., 2016; Boanini et al., 2010). Los CPs cuentan con varias especies: el fosfato de calcio amorfo (ACP), el fosfato cálcico dihidratado (DCPD), el fosfato octacálcico (OCP), el β -fosfato tricálcico (β -TCP) y la hidroxiapatita (HAP), por mencionar algunos (Candeiro et al., 2012); cada una se caracteriza por tener una relación de calcio/fósforo, (Ca/P) y solubilidades diferentes en función de su estructura, tabla 3.

Tabla 3. Especies de fosfato de calcio (Eliaz y Metoki, 2017; Lee et al., 2016).

Nombre	Símbolos	Fórmula	Ca/P	Solubilidad a 37 °C, -log(Ks)
Fosfato monocálcico monohidratado	MCPM/MCPH	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5	----
Fosfato monocálcico anhídrido	MCPA/MCP	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5	----
Fosfato dicálcicodihidratado (Brushita)	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	6.63
Fosfato dicálcico anhídrido (Monetita)	D CPA/DCP	CaHPO_4	1	7.02
Fosfato octacálcico	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	95.9
β-Fosfato tricálcico	β -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	29.5
α-Fosfato tricálcico	α -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	25.5
Apatita deficiente en calcio	ACP	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1.2-2.2	1.0
Hidroxiapatita	HA/HAP	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67	117.2

1.2.3.1.1 Hidroxiapatita, HAP

El fosfato de calcio hidratado, HAP, denominada como hidroxiapatita, por su nombre mineral, de fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, forma alrededor del 90 % peso seco de la composición inorgánica de los huesos; por lo cual es utilizada en áreas clínicas diversas, como ortopedia y odontología, por tener propiedades osteoconductoras, bioactivas y biocompatibles; debidas a la similitud, con el material inorgánico de los huesos y dientes (Eliaz y Metoki, 2017; Bohner et al., 2012).

La estructura química de la HAP tiene el grupo espacial $P6_3/m$, con parámetros de red de $a=9.432 \text{ \AA}$ y $c=6.881 \text{ \AA}$ (Bohner et al., 2012; Timofejeva et al., 2017), donde el calcio se coordina con el oxígeno de dos formas. En la primera coordinación de calcio, Ca(1), el fósforo forma tetraedros de cuatro oxígenos que rodean al calcio,

mientras la segunda coordinación, Ca(2), tiene cuatro grupos PO_4^{-3} circundantes, y dos OH^- en la superficie (Lin et al., 2015), figura 2.

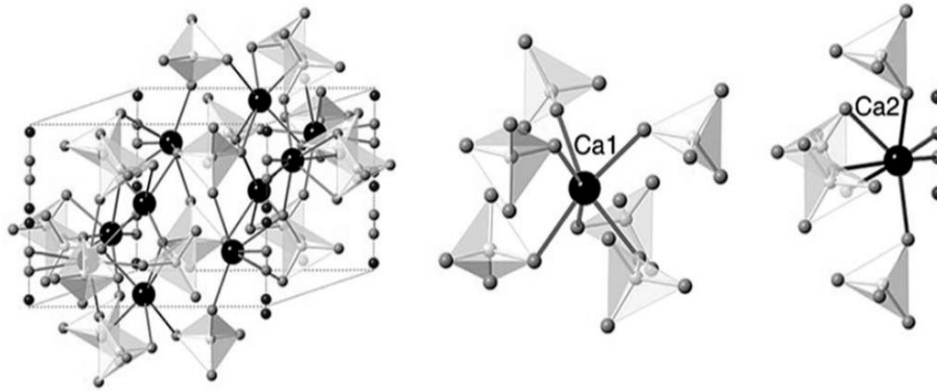


Figura 2. a) Estructura de la HAP; b) coordinación del calcio 1, Ca(1); c) coordinación del calcio 2, Ca(2) (Lin et al., 2015).

1.2.3.1.2 Beta fosfato tricálcico, β -TCP

El beta fosfato tricálcico apatítico (β -TCP) de fórmula $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ presenta tres polimorfos, el β -TCP con temperatura de transición a 1120°C a α -TCP, estable hasta 1470°C donde aparece el α' -TCP (Reyes et al., 2013). La fase beta es estable y se caracteriza por ser insoluble, parcialmente en agua a temperatura ambiente, utilizada en la sustitución del hueso (Kaavessina et al., 2015). El β -TCP se encuentra de forma biológica en el organismo, en los cálculos dentales, salivales y urinarios; caries dentales; cartílago artrítico; en algunos depósitos de tejidos blandos y, en la formación del hueso joven (Plazas y Ardila, 2016).

La estructura del β -TCP tiene el grupo espacial R3c (Elliott, 1994), con parámetros de celda $a=10.4352 \text{ \AA}$ y $c=37.4023 \text{ \AA}$, presenta 5 coordinaciones de calcio, la diferencia entre ellos es el número de coordinación con el oxígeno, para el calcio en la posición 1, Ca(1) coordina con 7; en la posición 2, el Ca(2) coordina con 6 u 8; el Ca(3) con 8; el Ca(4) con 3 y el Ca(5) con 6; mientras, el fósforo forma 3 tipos de tetraedros, los cuales dependen de la coordinación con el oxígeno (Yashima et al., 2003; Matsunaga et al., 2015), figura 3.

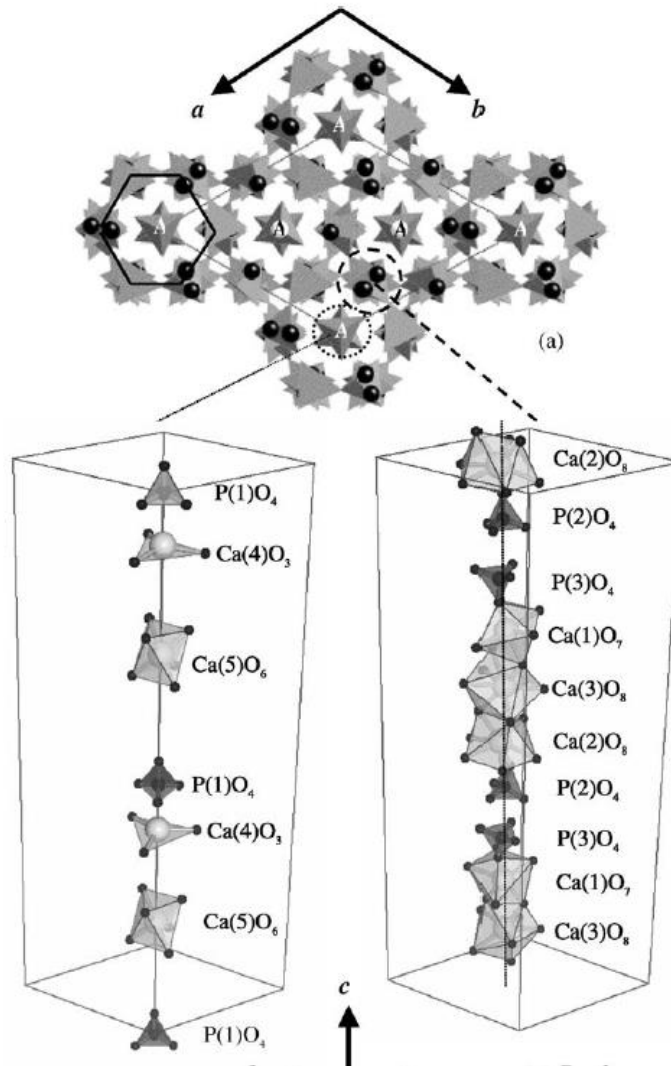


Figura 3. a) Estructura del β -TCP vista a lo largo de $[0001]$, b) y c) indican las configuraciones de los grupos CaO_n y PO_4 en las columnas b y c (Yashima et al., 2003).

1.2.3.1.3 Bifosfato de calcio BCP

El uso individual de HAP y β -TCP presenta limitaciones, en cuanto a la fragilidad y, la resistencia a la fatiga baja, razón del desarrollo de las cerámicas de fosfato bifásico de calcio, con base en HAP y β -TCP, en la obtención de mejores propiedades mecánicas, bioactividad y biodegradabilidad debido al control de la solubilidad del cerámico, lo que le permite ser un compuesto apto para la regeneración ósea (Ebrahimi et al., 2017; Logesh et al., 2019).

La HAP tiene una dureza de 7 en escala de Mohs mayor que, la del β -TCP de 5, por lo cual no es apta para su uso en implantes temporales; mientras el β -TCP tiene una tasa de disolución más rápida que la tasa de formación del hueso biológico, lo que lleva a un probable fallo mecánico del implante, por ello el BCP busca equilibrar la estabilidad de la HAP con el β -TCP, para la reconstrucción de defectos óseos en maxilofacial, aplicaciones dentales y ortopédicas (Eliaz y Metoki, 2017).

La proporción del BCP es difícil de comparar, debido a que estudios diversos han variado el contenido de HAP/ β -TCP desde 50/50 hasta 90/10, en donde ha sido empleada en animales y partes del cuerpo diferentes, por lo cual no hay un estándar de una mezcla ideal, por ello la investigación de andamios HAP/ β -TCP es escasa (Ho et al., 2016; Prezas et al., 2017; Ebrahimi et al., 2017; Liu et al., 2008). No obstante, el BCP en 70/30 de HAP/ β -TCP, aumenta la actividad celular respecto a las proporciones 50/50-90/10, debido a que la hidroxiapatita de forma natural se encuentra en cantidad mayor en el organismo (Shuai et al., 2013).

La relación Ca/P de la bifase influye en el comportamiento biológico del organismo (Ebrahimi et al., 2017), la relación 1.6, con HAP dominante y β -TCP en proporción menor, tiene mejor bioactividad en los fluidos respecto a relaciones menores a 1.5 y mayores a 2, por el control de solubilidad del cerámico, la HAP genera biocompatibilidad, mientras el β -TCP genera la biodegradación del implante (Shim et al., 2017; Shuai et al., 2013).

La bioactividad del BCP no depende únicamente de la proporción utilizada de HAP/ β -TCP, también lo es del tamaño de partícula, porque la matriz extracelular de los tejidos u órganos naturales tienen una dimensión menor a 60 nm, por ello la bifase debe cumplir este parámetro, para proporcionar una actividad biológica parecida a la de los tejidos a sustituir (Gong et al., 2015).

En el mejoramiento de las propiedades mecánicas del BCP, se ha investigado el desarrollo de materiales compuestos, con polímeros y metales para incrementar el valor de la resistencia a la tracción y el módulo de la elasticidad, en los tejidos a

sustituir o regenerar, conservando las características de la bifase, como la estabilidad, la dureza y la solubilidad en agua (Baradaran et al., 2014), tabla 4.

Tabla 4. Propiedades mecánicas de HAP y β -TCP (Eliaz y Metoki, 2017).

	Resistencia a la tracción (Mpa)	Módulo de Young(Gpa)
HAP	120/900	35/120
β-TCP	20/120	8.9/13.5

1.2.3.2 Obtención de BCP

La HAP, el β -TCP y el BCP se han producido a partir de fuentes naturales como el cascarón de huevo y de huesos de animales. La obtención de cerámicos a partir de hueso tiene costos de producción elevados, implican lavados ácidos o alcalinos, reacciones de pirólisis e incluso varios ciclos de calcinación. El producto de HAP con β -TCP por este método tiene otras fases, como el α -fosfato tricálcico, el fosfato octacálcico y el hidróxido de calcio (Sobczak et al., 2017), compuestos incompatibles con el organismo, lo que no hace viable la obtención de la bifase de HAP/ β -TCP para aplicaciones biomédicas, por ello se han obtenido por otras rutas de síntesis, tales como el de estado sólido, la mecano-síntesis, el sol-gel y, la coprecipitación, entre otras (Bohner et al., 2012).

La síntesis de fosfatos de calcio, por estado sólido, se produce a partir de los óxidos o las sales de fósforo y de calcio, molidas para ser sometidas a reacción y cristalización, con producto de tamaño de partícula nanométrico, entre 20-65 nm y con presencia de carbonatos; con las desventajas de tiempo largo de molienda y la temperatura de cristalización mayor a los 1000 °C durante varios días (Timofejeva et al., 2017; Arkin et al., 2015).

La mecano-síntesis se lleva a cabo con la micronización de los óxidos o las sales de fósforo y de calcio. En esta síntesis el producto sólido con tamaño de partícula de 200 nm está en función de la eficacia de la molienda, con tiempos de reacción, desde horas hasta de días, con equipo costoso (Reza et al., 2017).

En el método de sol-gel se realiza una suspensión coloidal con las sales de calcio y fósforo, la cual se hidroliza y condensa para formar un gel, con secado posterior y cristalización. Esta ruta de síntesis produce HAP de tamaño nanométrico en el intervalo de 19-115 nm, con presencia del óxido de calcio, CaO (Baradaran et al., 2014; Juárez et al., 2017).

La síntesis de BCP, por el método de coprecipitación, parte de las sales de fósforo y calcio, controlando la velocidad de adición y el pH; para obtener el precipitado se reposa un lapso de tiempo, posteriormente se filtra, lava, seca y cristaliza (Reyes et al., 2018; Juárez et al., 2017).

La síntesis por coprecipitación en comparación con los métodos de estado sólido, mecano-síntesis, y sol-gel, es amigable con el ambiente; produce un rendimiento mayor al noventa por ciento, con partículas de tamaño nanométrico de 8-80 nm (Kaavessina et al., 2015; Luo et al., 2015; Juárez et al., 2017), incluso la facilidad de variar las condiciones: la temperatura, tiempo y pH de síntesis; tiempo de añejamiento y secado; temperatura y tiempo de cristalización, lo que favorece el control de la morfología y el porcentaje de las fases presentes.

El estudio de la síntesis por coprecipitación, del BCP en relación 70/30, HAP/ β -TCP en un paso es escaso (Hong et al., 2017), mientras que en las publicaciones de esta relación las condiciones de síntesis no han sido reproducibles (Hong et al., 2017; Xidaki et al., 2018). En algunos trabajos usaron la mezcla de los fosfatos de calcio en forma individual, a través de la síntesis de HAP y β -TCP por separado (Marchi et al., 2013; Silva et al., 2016) o bien se adquirieron de forma comercial, para posteriormente realizar la mezcla de las fases; en el primer caso el consumo de tiempo fue mayor y el BCP careció de homogeneidad. Y, en el segundo, en la cual los reactivos se adquirieron comercialmente, el tamaño de partícula es mayor a los 100 nm y la pureza de los cerámicos están establecidos por el proveedor, no siempre del que se requiere, con el inconveniente de que los materiales necesitan sinterización (Xu et al., 2017; Tan et al., 2013).

1.2.4 Materiales compuestos

Un material compuesto es un sistema integrado, por la combinación de dos o más constituyentes, con estructuras y composiciones químicas diferentes e insolubilidad entre ellos, con la ventaja de conformar un material de características distintas a los de partida (Li et al., 2017; Watering et al., 2012), figura 4. La fase en proporción mayor forma una matriz continua rodeada por otras fases (Bao et al., 2019).



Figura 4. Materiales compuestos.

Los materiales poliméricos, metálicos o cerámicos debido a la limitación en sus propiedades químicas y mecánicas, no cumplen con todos los requisitos de bioactividad, rigidez, elasticidad y plasticidad para aplicaciones específicas. Por lo tanto, la mayoría de las investigaciones utilizan la combinación de materiales con atributos diferentes, para aprovechar la ventaja de cada especie individual al lograr un rendimiento optimizado, rugosidad de la superficie, propiedades mecánicas mejoradas y degradación (Bao et al., 2019).

1.2.4.1 Hueso

El hueso es un material compuesto presente en la naturaleza, el cual está formado en su peso seco por 65 % de material inorgánico y el 35 % de, orgánico; la primera porción está constituida por los fosfatos de calcio y la segunda por el colágeno (Narayanan et al., 2016). El hueso consta de dos partes principales, una cubierta compacta llamada hueso cortical y el núcleo poroso llamado esponjoso o hueso trabecular.

El hueso cortical es la capa densa que brinda protección y soporte al tejido, se compone de unidades de osteones que se repiten; mientras el hueso esponjoso está hecho de una estructura interconectada de trabéculas con espacios libres llenos de médula ósea. Estas unidades de trabéculas y osteones están compuestas de fibras de colágeno y cristales de fosfato de calcio, lo que permite la migración celular, vascularización y crecimiento de tejido nuevo. (Gong et al., 2015).

El hueso a diferencia de otros tejidos del organismo, no es inerte, es remodelado continuamente a partir de 3 tipos de células: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. En conjunto tienen funciones importantes como la locomoción, el soporte, la protección de tejido suave y el alojamiento de la médula ósea (Florencio et al., 2015).

La remodelación ósea es un proceso complicado por el cual el hueso viejo es reemplazado por nuevo, en un ciclo de tres fases: 1) inicio de la resorción ósea por osteoclastos, 2) la transición de la reabsorción y 3) la formación ósea por osteoblastos. Debido, a que el proceso se produce por las acciones coordinadas de los osteoclastos, los osteoblastos, los osteocitos y células de revestimiento óseo que forman la estructura anatómica temporal de la unidad básica multicelular (BMU) (Florencio et al., 2015; Riancho y Delgado, 2011).

El sustituto del tejido óseo debe funcionar y emular las condiciones naturales del hueso, como la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, la estructura química y las

propiedades mecánicas, para proporcionar un andamio temporal de regeneración de tejido en el organismo huésped, tabla 5 (Florencio et al., 2015).

Tabla 5. Propiedades mecánicas del hueso (Monmaturapoj et al., 2017; Roohani et al., 2016; Rho et al., 1993).

	Resistencia a la compresión (Mpa)	Resistencia a la tracción (Mpa)	Módulo de elasticidad (Gpa)
Cortical	100-150	68.9	18.6--20.7
Esponjoso	0.2-40	3.5	10.4-14.8

El hueso se ha reproducido de forma sintética, con base en los fosfatos de calcio, como el BCP y las matrices poliméricas. Los primeros sustituyen al material inorgánico, cuyo tamaño de partícula nanométrico se requiere entre los 20 a 60 nm, indispensables en las biocerámicas; ya que favorece la biocompatibilidad con el organismo y la afinidad con las células formadoras de hueso (Abraham, 2014; Chen et al., 2013; Narayanan et al., 2016; Lee et al., 2013). Mientras que, en la parte orgánica del hueso se usan polímeros, como el ácido poliláctico, PLA, debido a su biodegradación y biocompatibilidad, favoreciendo la regeneración y el reemplazo óseo (Watering et al., 2012, Narayanan et al., 2016; Lee et al., 2013).

1.2.4.2 Incorporación de materiales compuestos para la sustitución de tejido óseo

La conformación de los materiales compuestos de BCP con PLA ha sido y se continúa investigando para su uso como implantes de regeneración ósea, en el aumento de la osteoconductividad, que permite al material proveer un ambiente apropiado para la formación de hueso nuevo, induciendo el crecimiento óseo, regenerando el hueso dañado (Esposito et al., 2017).

Las características deseadas en la conformación del material compuesto son la dispersión del cerámico en el polímero, con rendimientos mayores al 80 %, lo cual es posible con la formación de microesferas a partir de la evaporación de disolvente, con el método de la doble emulsión sólido/aceite/ agua, (so/ac/ag) (Du et al., 2013; Qui et al., 2000). El método consiste en realizar una solución de polímero en un disolvente orgánico inmiscible en agua, seguido de la dispersión

del cerámico en la solución polimérica. La dispersión se agrega a una fase acuosa formando una emulsión continua obteniendo gotitas discretas. Estas microesferas se difunden en la interfase agua/aire. A medida que se produce la evaporación del disolvente, las microesferas se endurecen, se separan por filtración y secado (Qui et al., 2000; Russias et al., 2006).

El tamaño de la microesfera está en función de la concentración del polímero a utilizar, en el caso del PLA a concentraciones mayores al 12 %m/v, el tamaño de la esfera aumenta hasta 300 μm , mientras que para concentraciones de 4% m/v, se esperan tamaños menores a las 100 μm del material compuesto, lo que fomenta la actividad en el plasma sanguíneo (Qui et al., 2000).

La proporción de fosfato de calcio respecto al polímero se ha igualado a la del hueso en 70/30 respectivamente, por el método de emulsión doble, con la desventaja de una proliferación celular escasa, pérdida de resiliencia o capacidad de absorción de energía y propiedades mecánicas deficientes (Russias et al., 2006). Los contenidos de cerámico del 10 al 30 %m/m mejoran las propiedades osteoconductoras y mecánicas, con la dispersión homogénea del cerámico en la matriz polimérica, reduciendo la fragilidad del andamio (Bao et al., 2019; Ferri et al., 2016; Monmaturapoj et al., 2017). Las investigaciones que se han realizado con las proporciones del 10 al 30 %m/m en contenido de cerámica, tienen propiedades osteoconductoras, de mayor regeneración ósea, respecto a las que tienen contenidos mayores al 50 %m/m (Ferri et al., 2016). La proporción 10/90 %m/m de cerámica/polímero ha permitido que el cerámico se encuentre embebido en la matriz polimérica dando por resultado mejores propiedades mecánicas, con respecto a las relaciones 20/80 o 30/70 (Tarafder et al., 2013).

La formación de apatita en la superficie del hueso, es un requisito esencial cuando se implanta en un cuerpo vivo. Un método de evaluación del proceso de mineralización biomimética consiste en la formación *in situ* de los minerales inorgánicos y su unión al hueso, a través de un fluido corporal simulado (FCS); el cual, es una solución electrolítica que reproduce la composición inorgánica del

plasma sanguíneo humano (Du et al., 2013; Russias et al., 2006; Kokubo y Takadama, 2006).

El propósito del proyecto fue desarrollar una metodología novedosa y sencilla para la obtención de los andamios de BCP/PLA por impresión 3D, en proporción 10/90 %m/m, debido a que se mejora la regeneración del hueso, por la incrustación del BCP en la matriz PLA, además los estudios son escasos en comparación con las relaciones de 20 y 30 % de cerámico en la sustitución de hueso. El BCP y el PLA fueron elegidos para realizar un andamio de regeneración ósea de composición química similar a la del hueso, para emular su comportamiento.

El desarrollo del proyecto se realizó, por medio de la síntesis para HAP/ β -TCP en 70/30 para favorecer la osteoconductividad en la bifase, la cual se hizo por el método de coprecipitación. Esto se debió a la necesidad de obtener la BCP en una etapa de síntesis con la relación 70/30, la pureza del 99 % y tamaño de partícula menor a 60 nm, debido a la falta de reproducibilidad en las investigaciones publicadas (Hong et al., 2017; Xidaki et al., 2018). Para lo cual, en el trabajo experimental se estudiaron las condiciones siguientes: el pH, la temperatura y el tiempo de cristalización. En cuanto a la temperatura de síntesis y el tiempo de añejamiento, fueron obtenidos en estudios previos (Reyes et al., 2018; Juárez et al., 2017).

La integración del biomaterial, BCP/PLA, se realizó en la proporción 10/90 %m/m, para la formación de material homogéneo, con actividad celular, a partir del método de doble emulsión sólido-aceite-agua. El material compuesto fue extruido, en función de la temperatura para la obtención de los filamentos, para ser impreso por 3D, en función de la velocidad y la temperatura de impresión.

La caracterización de los materiales obtenidos en la síntesis, la conformación e impresión se llevó a cabo, por: difracción de rayos X de polvos (DRX), espectroscopía de absorción infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido (MEB) y el ensayo de compresión.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Desarrollar la metodología de síntesis, la conformación y la impresión 3D de andamios de material compuesto BCP/PLA, para biomateriales de regeneración ósea.

2.2 Objetivos específicos

- Estudiar las condiciones de la síntesis del biocerámico BCP, con base en HAP/ β -TCP, 70/30, por el método de coprecipitación.
- Integración del material compuesto BCP/PLA, 10/90, por el método de emulsión doble sólido/aceite/agua y la obtención del filamento.
- Realizar la impresión 3D para la conformación del andamio BCP/PLA por deposición de material fundido.
- Caracterizar el biocerámico, el material compuesto y el andamio, con las técnicas de difracción de rayos X de polvos (DRX), el cálculo del tamaño de partícula por la ecuación de Scherrer, espectroscopía de absorción infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido (MEB) y ensayo de compresión.

2.3 Hipótesis

Si se producen biomateriales BCP/PLA con una dispersión homogénea del cerámico en el polímero, se obtendrán andamios impresos por 3D con resistencia a la compresión comparable con las del hueso esponjoso, para su aplicación en implantes de regeneración ósea.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos

- ✚ Nitrato de calcio tetrahidratado, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: pureza 99.95 %.
- ✚ Fosfato de amoniodibásico, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: pureza 99.98 %, P.M. 132.063 g/mol.
- ✚ Hidróxido de amonio, NH_4OH : 28.49 %, P.M. 38.049 g/mol.
- ✚ Cloruro de metileno, CH_2Cl_2 : pureza 99 %, P.M. 84.93 g/mol.
- ✚ Alcohol polivinílico, PVA: pureza 99 %, P.M. 89,000-98,000.
- ✚ Ácido poliláctico, PLA: biomaterial biodegradable.
- ✚ Agua destilada, H_2O .

3.2 Equipo

La extrusora Filastruder Pro (Laboratorio de Cerámica, Fac. Química, UNAM), con boquilla de salida circular de 1.75 mm se utilizó para la obtención del filamento del material compuesto.

La impresora 3D Flashforge Creator-Pro (Laboratorio de Cerámica, Facultad de Química, UNAM), que se usó en la impresión de los andamios, con la capacidad de construcción de (227 x 148 x 150) mm, resolución de capa de (100-500) μm , y diámetro de cabezal de 0.4 mm.

3.3 Caracterización

3.3.1 Difracción de rayos X de polvos (DRX): la caracterización de las fases se realizó con un difractómetro Siemens D5000 (USAII-UNAM), radiación de $\text{CuK}\alpha 1$ filtrada con Ni, $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$, con una constante de tiempo de 0.4 y constante de paso angular de 0.02, a 30 Kv y 25 mA, de 10° a 65° de 2θ .

3.3.1.1 Tamaño de partícula: se determinó a partir del difractograma de rayos X, por medio de la ecuación de Scherrer:

$$\tau = \frac{\lambda * 0.89}{\beta \cos\theta}$$

Donde: λ = longitud de onda de rayos X; β = la intensidad de la señal mayor; θ = ángulo de Bragg; τ = tamaño del cristal

3.3.2 Espectroscopía de absorción infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR): la caracterización y el análisis de grupos funcionales se llevó a cabo en un espectrofotómetro de FTIR Spectrum RXI de Perkin-Elmer (USAII-UNAM) y UATR Two (Laboratorio de química inorgánica 1C, F. Química, UNAM), en el infrarrojo medio de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.3.3 Microscopía óptica: la visualización de la microestructura de los materiales se realizó en el microscopio óptico Carl Zeiss 2x (Laboratorio de Cerámica, Facultad de Química, UNAM).

3.3.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB): el estudio de la topografía y análisis elemental de superficie del material, se hizo en el equipo JEOL JSM-5900-LV (USAII-UNAM) de resolución 3.0 nm (SEI), HV, 5.0 nm (BEI) LV con microanálisis Oxford ISIS.

3.3.5 Ensayo de compresión: la resistencia de compresión, del andamio de BCP/PLA, se ejecutó en una máquina de prueba mecánicas Humboldt HM-280 (Laboratorio de Cerámica, Facultad de Química, UNAM).

3.4 Procedimiento experimental

La metodología experimental para la obtención de los andamios 3D, con base en el material compuesto, a base de HAP/ β -TCP y PLA, se desarrolló en tres etapas, descritas a continuación:

3.4.1 Síntesis del biocerámico

Las síntesis del BCP de HAP y β -TCP se realizó en una proporción molar 1:61, para 5 g de producto, a través de la adición, de 107 mL de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 M, por goteo y agitación constante, a 166 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.08 M; terminada la adición, se ajustó y controló el pH de 8 a 10, con NH_4OH y la temperatura, desde 45 a 55 °C, durante 3 h; al finalizar, se reposó, por 24 h para, su filtración posterior y el lavado del sólido, con H_2O destilada; el producto se secó, aproximadamente 24 h. Finalmente, se probaron las temperaturas y los tiempos de cristalización desde 750 hasta 900 °C y desde 0.5 hasta 14 h, respectivamente. Un resumen de las pruebas se encuentra la tabla 6 (Anexo I).



Figura 5. Metodología para la síntesis de BCP por el método de coprecipitación.

3.4.2 Integración cerámico/polímero

El material compuesto BCP/PLA, en proporción 10/90 %m/m, se realizó con dos disoluciones, una de 400 mL de PVA al 0.5 %m/v a 75 °C y otra de 135 mL de PLA al 4 %m/v en cloruro de metileno a 25 °C. Para la dispersión del cerámico en el polímero, a la disolución de PLA se agregó el BCP, con un tamaño de partícula menor a 60 nm, durante 1 h, con agitación constante. Al término, la dispersión se agregó, por goteo a la disolución de PVA asistido por sonicación, durante 35 min. Posteriormente, la eliminación del cloruro de metileno a 75 °C, con agitación, por 2 h. El material se reposó, alrededor de 16 h, después se filtró y lavó con H₂O destilada para eliminar el PVA. Al final, el material compuesto se secó a temperatura ambiente, desde 22 a 25 °C, figura 6.

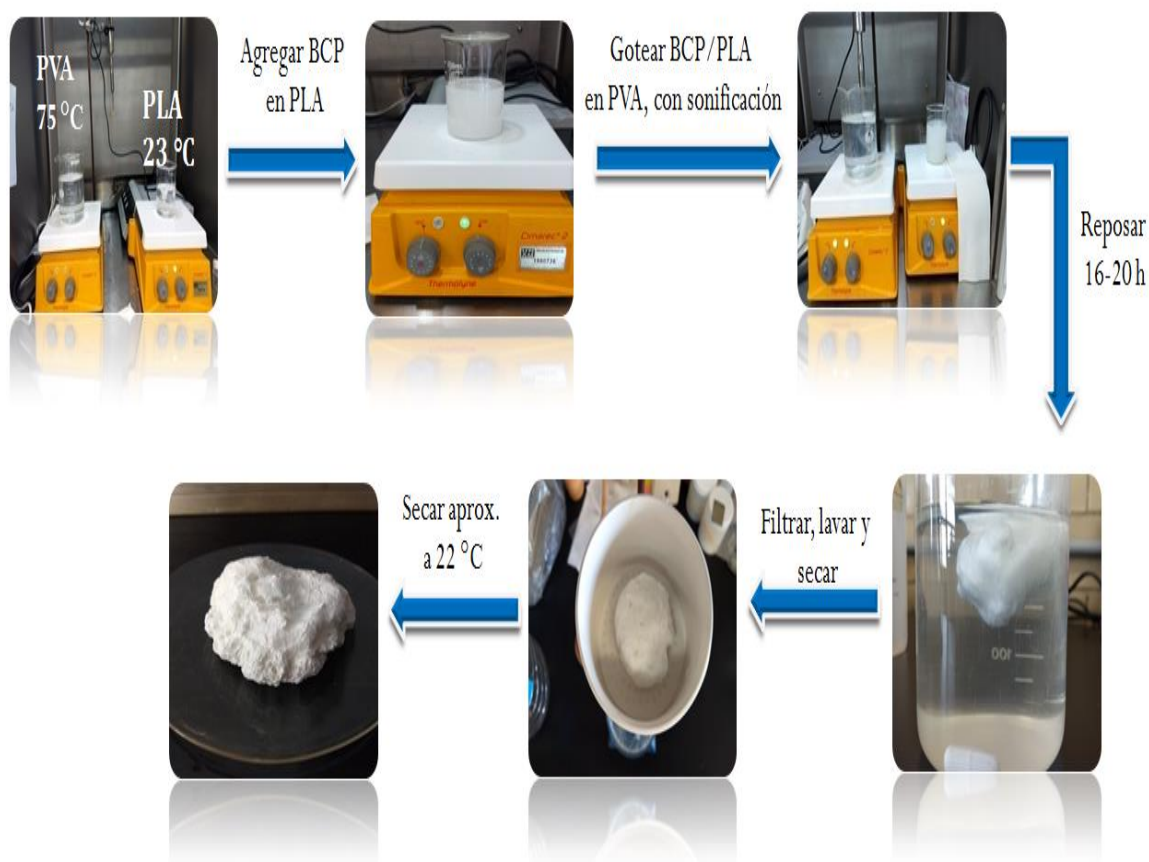


Figura 6. Conformación del material compuesto BCP/PLA por el método de emulsión doble.

3.4.2.1 Extrusión

El compuesto BCP/PLA se cortó en fragmentos, de aproximadamente 5 x 5 mm; los cuales se colocaron en la tolva del extrusor, previamente calentado en el intervalo de 145-155 °C por arriba de la transición vítrea, T_g , del PLA, de 69 °C; con el propósito de obtener un material fluido y un filamento uniforme, figura 7.

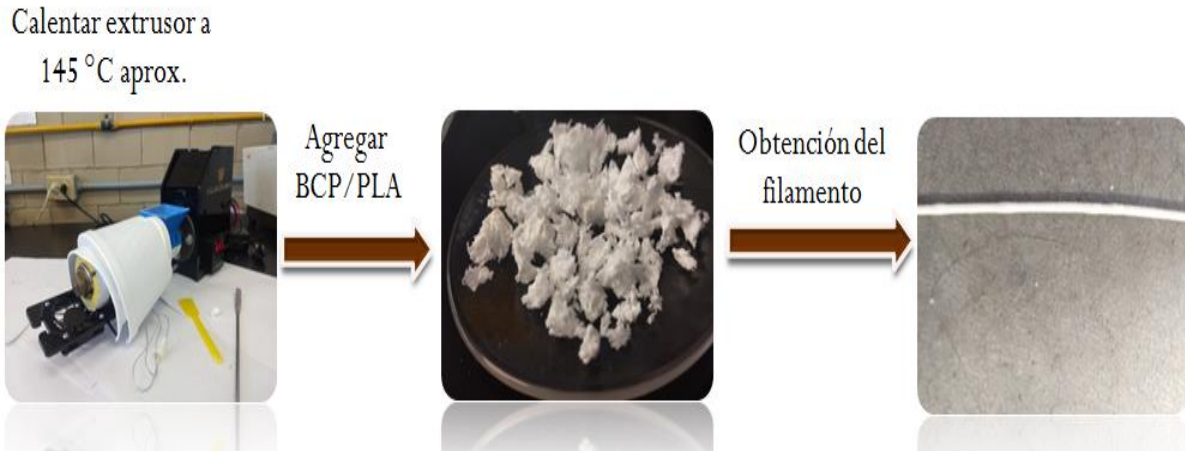


Figura 7. Extrusión del material BCP/PLA.

3.4.3 Impresión 3D

El diseño del andamio de BCP/PLA, por medio de la impresión 3D de su filamento, estuvo en función de la velocidad y la temperatura, figura 8.

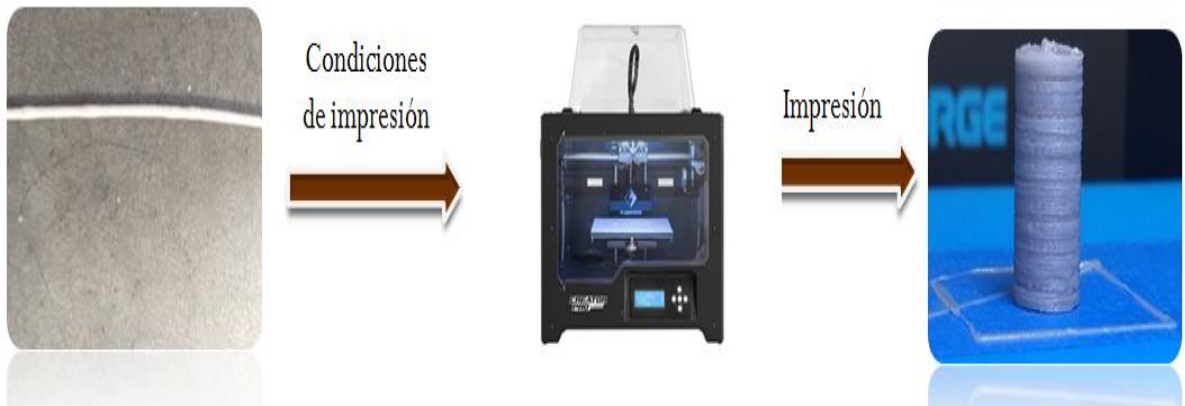


Figura 8. Impresión de andamios de BCP/PLA.

3.4.3.1 Pruebas mecánicas de compresión

El diseño de impresión de las probetas para el material compuesto tuvo como antecedente el trabajo de Juárez, 2018, en el cual se realizaron de acuerdo a la Norma ASTM D5024-95, con las características de altura de 20 mm y diámetro de 10 mm, con un entramado de 0.7 mm, figura 9.

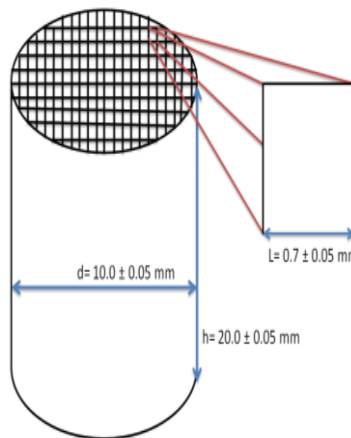


Figura 9. Probeta de compresión para el BCP/PLA.

3.4.3.2 Fluido corporal simulado, FCS

La solución FCS se preparó para un volumen de 100 mL, con la disolución de cada uno de los reactivos, en agua destilada, en el orden siguiente: NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄·3H₂O, MgCl₂·6H₂O, HCl, CaCl₂ y NaSO₄, a una temperatura de $36.5 \pm 1.5 \text{ }^\circ\text{C}$, con agitación constante, seguido del control de pH a 2.0 ± 1 . Después, se le adicionó lentamente el tris (hidroximetil) aminometano [(CH₂OH)₃CNH₂], con ajuste del pH a 7.4, con HCl, a $36.5 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$, las cantidades utilizadas se muestran en la tabla 7 (Anexo II).

4. RESULTADOS

4.1 Síntesis del cerámico BCP

En el trabajo experimental se analizaron las condiciones siguientes: el pH, la temperatura y el tiempo de cristalización. Los resultados mostraron que a partir de la relación Ca/P 1.61 en función de la variación del pH, junto con la temperatura y el tiempo de cristalización, se obtuvieron las proporciones de HAP/ β -TCP, siguientes: 50/50, 60/40, 70/30, 80/20 y 90/10; según sus análisis de DRX y de FT-IR (Anexo III).

Las condiciones de síntesis y de cristalización del BCP, con una relación 1.61 molar de HAP y β -TCP fueron: la temperatura de 45 a 55 °C, un tiempo de reacción de 3 h, a un pH de 9, con un tiempo de añejamiento para la precipitación del sólido de 24 h; y, la cristalización a 750 °C, durante 2 h. La obtención del BCP se realizó de forma quíntuple, garantizando la reproducibilidad del método, con productos de pureza mayor al 95 % y tamaño de partícula menor a los 60 nanómetros.

4.1.1 DRX y tamaño de partícula

El análisis de identificación del BCP, por DRX determinó dos fases, una en proporción mayor identificada como hidroxiapatita JCDPS 01-089-4405 (d_{hkl} (a): 3.19₅, 2.88_y y 2.63₇) y la segunda como β -fosfato tricálcico JCDPS04-014-2292 (d_{hkl} (a): 2.83_x, 2.79₅ y 2.75₃), figura 10. La composición promedio final del BCP en las muestras, fue de 72/28, con respecto a la HAP y el β -TCP, la relación se estimó con el programa Match! asistido por FullProf. El tamaño de partícula promedio para las 5 muestras, en el BCP fue mixto, por la presencia de las dos fases, para la HAP fue de 36.95 nm, mientras que para el β -TCP de 51.33 nm.

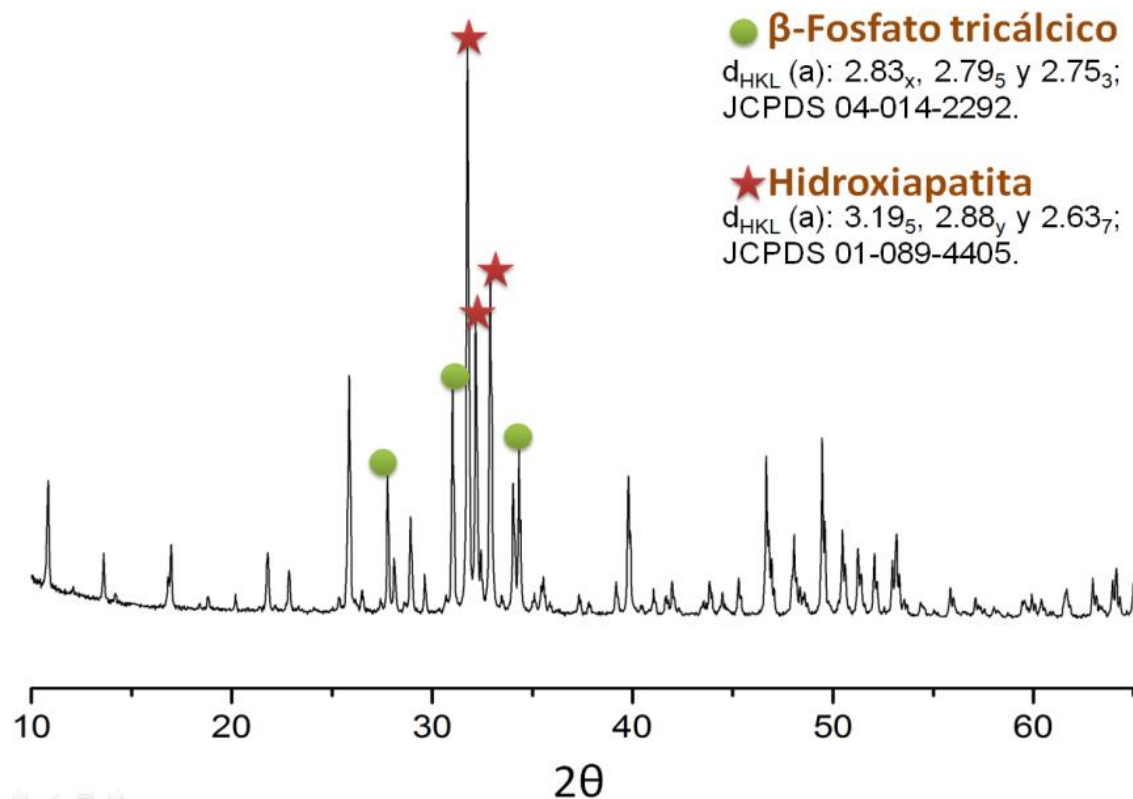


Figura 10. Difractograma de RX, del BCP sintético.

4.1.2 FT-IR

El análisis del espectro de FT-IR del BCP reafirmó los resultados de DRX, debido a la presencia de las fases del BCP: HAP y β -TCP. Las bandas correspondientes a la bifase se observaron en, 3590 y en 680 cm^{-1} relacionadas al estiramiento del hidroxilo, OH estructural de la HAP; la banda en 3590 cm^{-1} se ha observado que, sólo aparece en el espectro cuando hay cantidades significativas de la hidroxiapatita en la mezcla (Montañez et al., 2018). Las bandas presentes en 947 cm^{-1} y en 650 cm^{-1} se atribuyeron al estiramiento simétrico de los PO_4^{3-} , característicos del β -TCP. Las señales de los fosfatos características de ambas fases del BCP, son en 580 cm^{-1} del modo de vibración simétrico del O-P-O; y las señales de 1000 y 1100 cm^{-1} , relacionadas a la vibración de estiramiento asimétrico del enlace P-O, figura 11 (Owen et al., 2017; Ebrahimia et al., 2017).

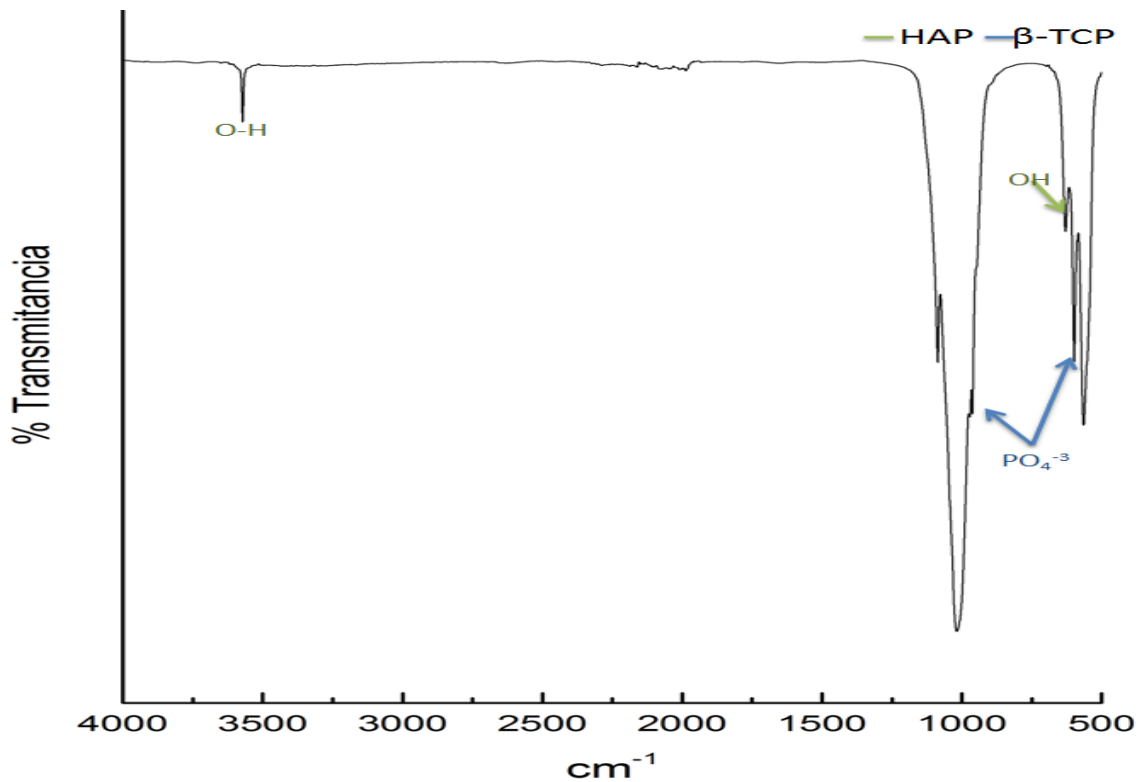


Figura 11. Espectro de IR del BCP obtenido.

4.1.3 MEB

En el análisis del bifosfato de calcio por MEB, con electrones secundarios, mostró la formación de partículas pequeñas definidas, que se asociaron para formar aglomerados micrométricos, irregulares y porosos de dimensión de 13 hasta 19 μm , figura 12a. En la figura 12b se presenta una región con amplificación a x10,000 en la cual se reveló la presencia de agregados semiesféricos, granulares y porosos, con diámetro menor a 2 μm , formados con partículas ultrafinas de BCP, las cuales presentaron una morfología de nano-hojuelas similar a los resultados de: Martínez y Esparza, 2008; Petro et al., 2003; Rivera et al., 2011; Berg, 2017.

El microanálisis por EDS, con electrones retrodispersados, indicó una relación Ca/P en el intervalo de 1.48 a 1.67, diferente a la de partida de 1.61; estos resultados sugirieron, que en la muestra se podría tener una hidroxiapatita estequiométrica e inclusive la aparición de apatita deficiente en calcio (Ling y Abdul 2019; Berg, 2017).

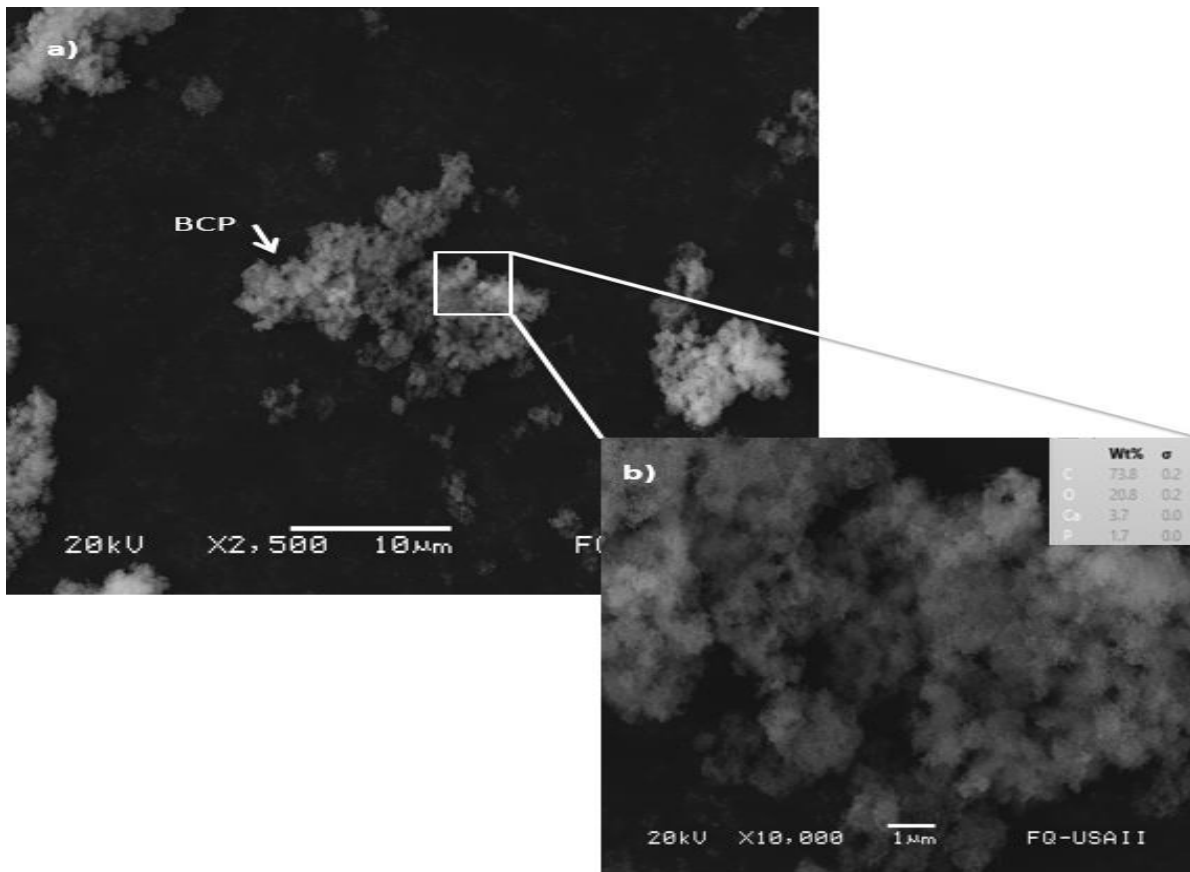


Figura 12. Micrografía de BCP a) aglomerados de BCP, b) morfología y composición de los aglomerados.

4.2 Material compuesto: BCP/PLA proporción 10/90 %m/m

En el proceso de formación de las microesferas, el método de emulsión doble, s/ac/ag, tuvo un rendimiento alto del 86 % en peso, considerando la eliminación del cloruro de metileno y del alcohol polivinílico, utilizado como tensoactivo.

4.2.1 Microscopía óptica

El material compuesto de BCP/PLA, se apreció por microscopia óptica, con aumento de 2x, figura 13, en la cual se observa un color homogéneo; mientras la superficie fue rugosa y discontinua por la presencia de huecos, y la aparición de aglomerados semiesféricos de las partículas del cerámico BCP, en la matriz polimérica del PLA.

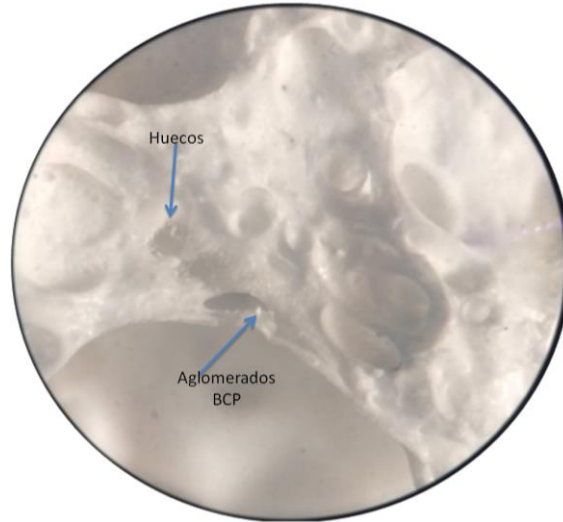


Figura 13. Material BCP/PLA por microscopia óptica 2x.

4.2.2 FT-IR

En la caracterización del material compuesto BCP/PLA y de los precursores por medio de FT-IR, se identificaron las señales asociadas a los grupos funcionales del cerámico/polímero (Jin et al., 2014; Lu et al., 2018), figura 14. La matriz polimérica de PLA se identificó con las vibraciones en 3000 cm^{-1} , relacionada al estiramiento del enlace C-H, debida a los alcanos; la señal en 1740 cm^{-1} se correlacionó con la tensión simétrica del enlace C=O; seguida de las bandas en $1400\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ concernientes a las vibraciones del enlace C-H asociadas a los metilos; a diferencia de las vibraciones 1200 y 1100 cm^{-1} y la señal en 700 cm^{-1} atribuidas al enlace C-C relacionadas al grupo éster del PLA. Para el cerámico BCP se apreció, una banda de intensidad baja en 3500 cm^{-1} del enlace O-H estructural de la HAP, la vibración en 1000 cm^{-1} , fue identificada para el enlace P-O, mientras que la banda de 1100 cm^{-1} se superpuso con la del enlace O=C-O del polímero, debido a la cantidad menor del cerámico en el material compuesto; las señales con intensidad baja en 550 y 680 cm^{-1} se asociaron a los fosfatos de la bifase (Jin et al., 2014; Sanyang et al., 2016; Lu et al., 2018; Montañez et al., 2018). La banda en 3300 cm^{-1} del OH absorbido, se relacionó a la humedad que el material captó del ambiente (Sobczak et al., 2017).

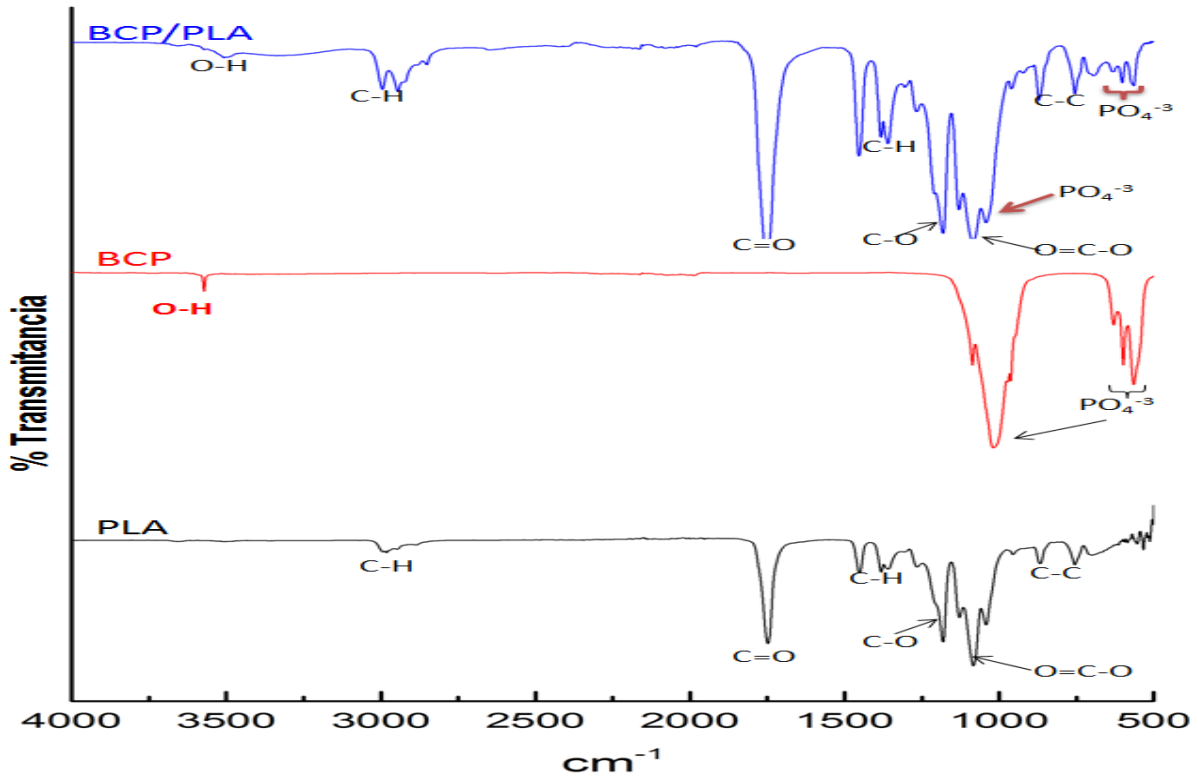


Figura 14. Comparación de IR del BCP/PLA con las materias de los precursores.

4.2.3 MEB

El material compuesto BCP/PLA observado por MEB con electrones retrodispersados con un aumento x2500, mostró una región de agregados semiesféricos de BCP con distribución homogénea en la matriz polimérica PLA, junto con aglomerados de BCP de tamaño de alrededor de 1 a 3 μm , figura 15. En el mapeo del análisis químico se observaron irregularidades morfológicas de la superficie de la matriz polimérica, con la presencia de huecos menores a 45 μm , debido al aire ocluido, además de aglomerados irregulares del BCP distribuidos al azar en el PLA. El mapeo del conformado presentó C y O, debido a la composición del polímero, mientras el Ca, P y O a la del cerámico. Todos los elementos estuvieron distribuidos de forma homogénea a lo largo del compuesto, lo que indicó que el BCP está disperso en el PLA, figura 16 (Ardilla et al., 2011; Lee et al., 2011; Bleach et al., 2002).

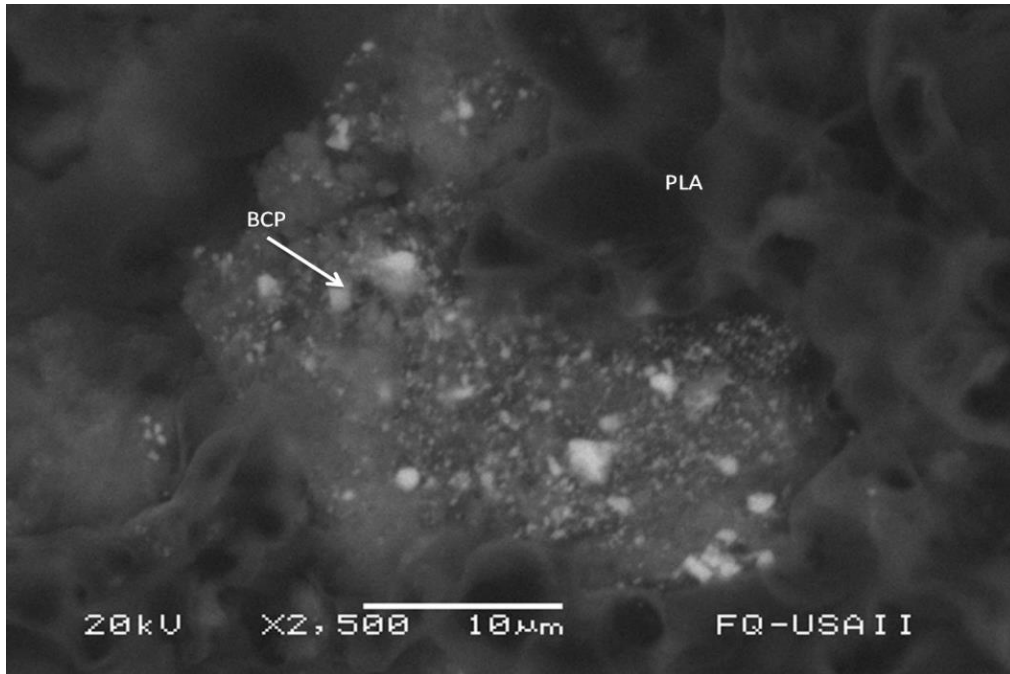


Figura 15. Micrografía del material compuesto BCP/PLA.

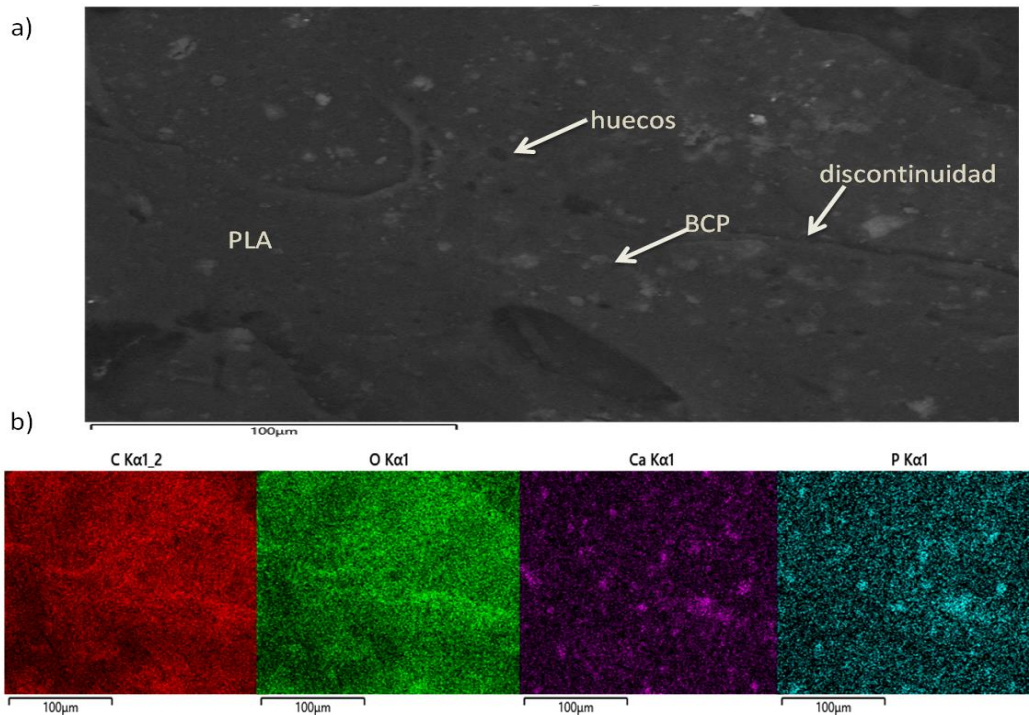


Figura 16. MEB a) Sección de la muestra BCP/PLA para el mapeo, b) Mapeo de la muestra BCP.

4.2.4 Extrusión del BCP/PLA

El filamento del material compuesto de BCP/PLA se obtuvo por el proceso de extrusión con la característica de semiflexibilidad debida al polímero.

4.2.4.1 Microscopía óptica

La microscopía óptica (aumento 2x), figura 17, mostró un color homogéneo, con bordes discontinuos debido a la presencia de aglomerados de cerámica, los cuales formaron pequeñas protuberancias en la superficie del filamento.

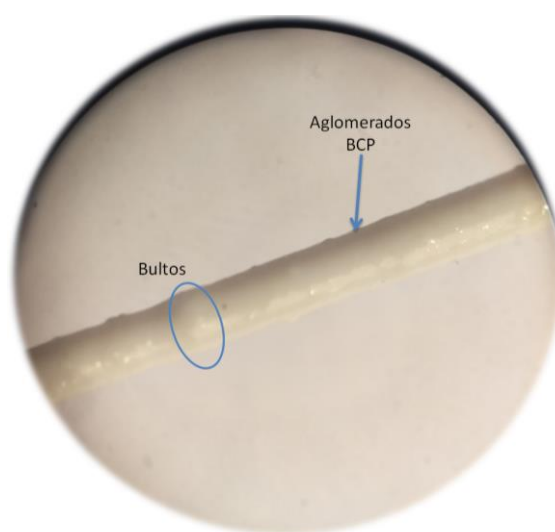


Figura 17. Filamento del BCP/PLA obtenido por extrusión en microscopía óptica 2x.

4.2.4.2 FT-IR

En el análisis por FT-IR, del filamento del BCP/PLA, se encontraron las bandas asociadas a los grupos funcionales de sus precursores, figura 18. El espectro a diferencia del material compuesto sin extruir, presentó una banda de intensidad mayor atribuida al cerámico, con respecto a la figura 14, debido a los aglomerados del BCP en la superficie. Las señales correspondientes a las del PLA fueron: las vibraciones en 2950, 1400 y 1300 cm^{-1} de metilos; la banda en 1750 cm^{-1} del enlace C=O por el carbonilo; las señales presentes en 1200 y 1100 cm^{-1} del grupo éster del PLA y la vibración en 700 cm^{-1} del enlace C-C. Las bandas del cerámico fueron: la señal en 3500 y 680 cm^{-1} del O-H estructural; la vibración en 1000 cm^{-1}

de la HAP y la de 980 cm^{-1} del β -TCP, asociada a de los fosfatos; y las vibraciones asimétricas en $580\text{-}680\text{ cm}^{-1}$ de los PO_4^{3-} de la mezcla BCP (Jin et al., 2014; Sanyang et al., 2016; Lu et al., 2018; Montañez et al., 2018). La banda en 3300 cm^{-1} se mantuvo relacionada a la humedad del ambiente (Sobczak et al., 2017).

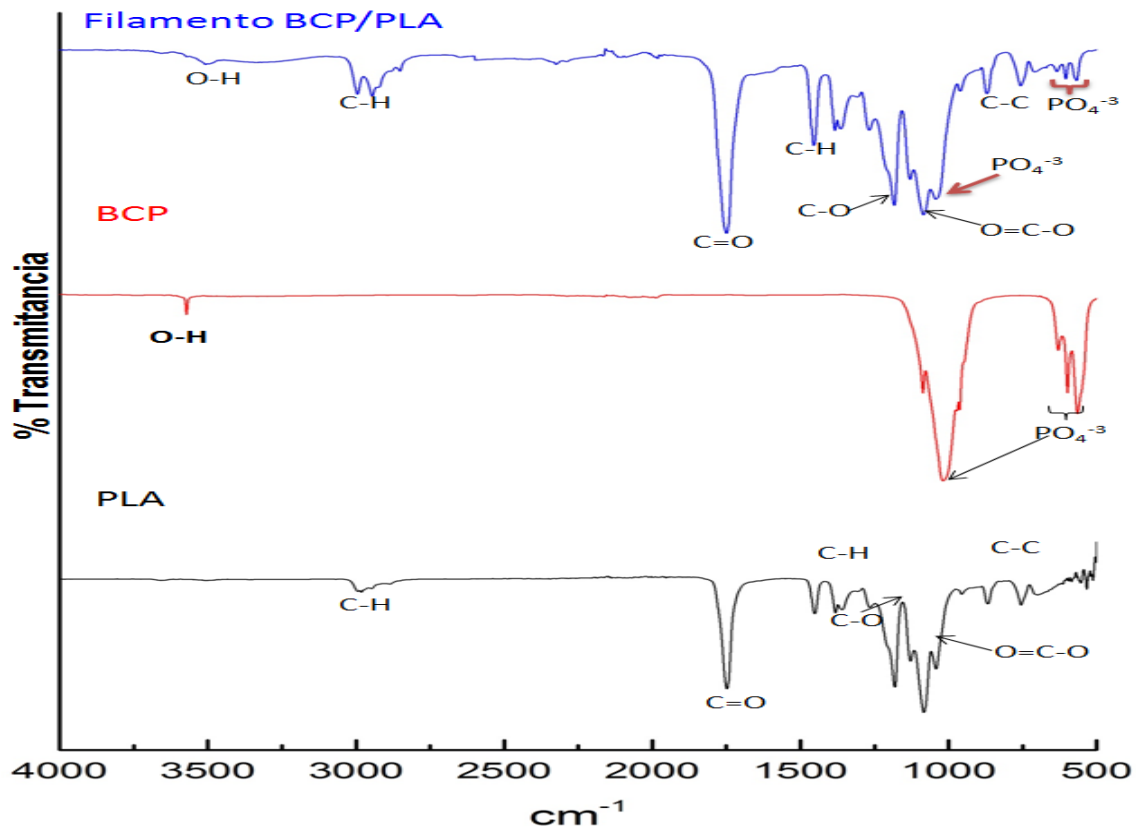


Figura 18. Espectro IR del filamento del BCP/PLA obtenido por extrusión comparado con los precursores.

4.2.4.3 MEB

La micrografía del filamento de BCP/PLA con electrones secundarios presentó bordes continuos del material al aumento de $\times 43$, con una superficie homogénea, con la presencia de algunos aglomerados semiesféricos de la cerámica, y la formación de bultos atribuidos a la presencia de partículas BCP, dado que está embebida en la matriz del PLA, figura 19. La apariencia del material en el análisis elemental, figura 20a, mostró una superficie, lisa sin discontinuidades y deformaciones, con la incorporación de aglomerados semiesféricos de BCP,

distribuidos en la matriz de PLA, El mapeo del conformado indicó la dispersión homogénea de los elementos C, O, Ca y P, los cuales correspondieron al PLA y BCP, figura 20, conservando la composición química del conformado sin extruir (Lee et al., 2011; Bleach et al., 2002).

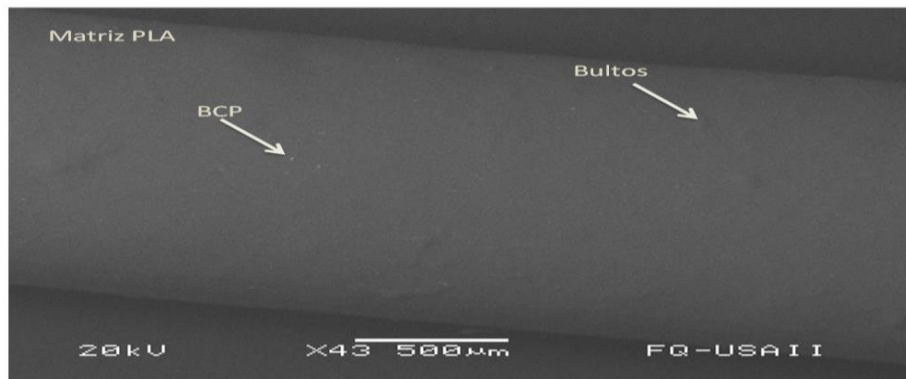


Figura 19. Filamento del BCP/PLA por MEB.

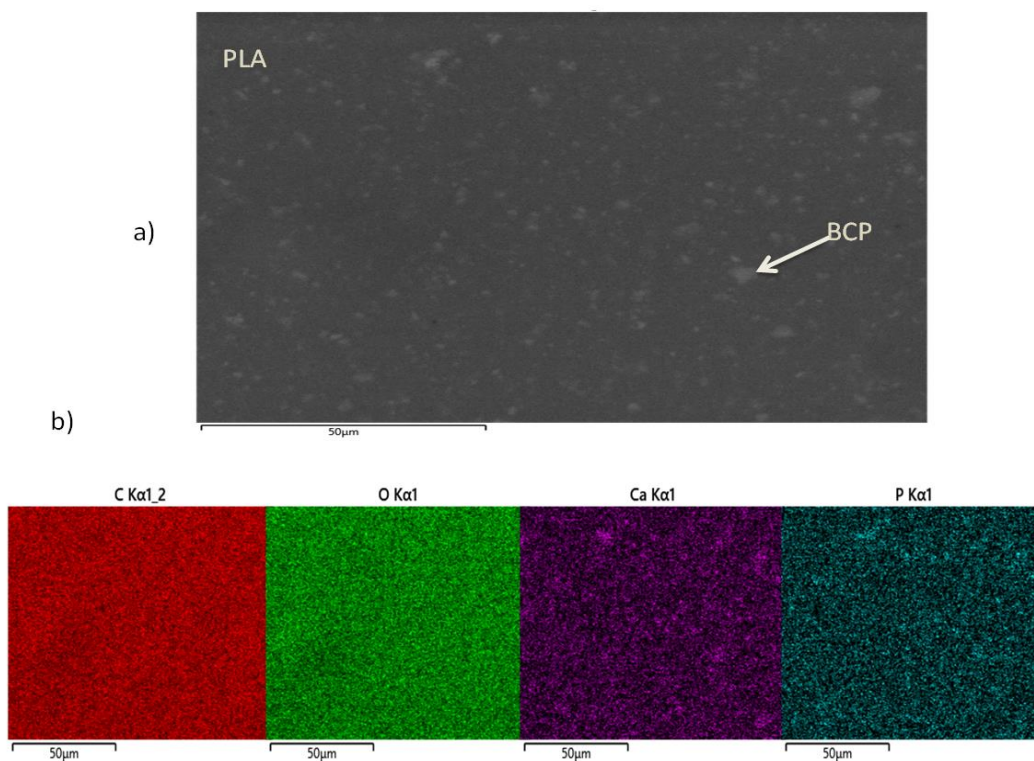


Figura 20. MEB a) Superficie del filamento del BCP/PLA obtenido por extrusión, b) mapeo de la superficie de a.

4.3 Impresión 3D

4.3.1 Microscopía óptica

La impresión del material compuesto de BCP/PLA se realizó a partir del filamento extruido, para obtener probetas, las cuales se analizaron por microscopía óptica con un aumento 2x, figura 21, en donde se apreció la adhesión entre las capas con el borde discontinuo de la probeta, sin aglomerados visibles de BCP en el andamio; las líneas de construcción del enrejado y entre las capas fueron en su mayoría continuas, con algunas irregularidades por la presencia de remanentes de material.

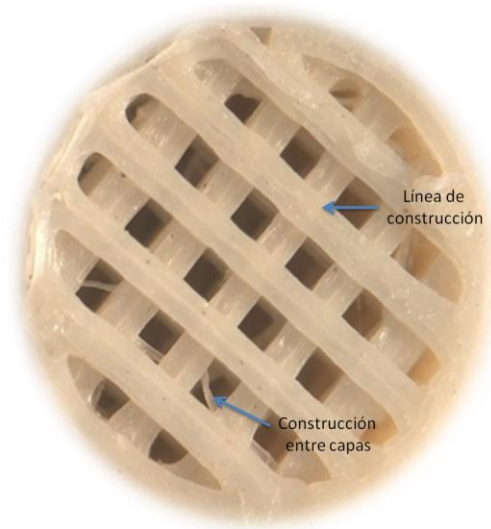


Figura 21. Impresión 3D del material BCP/PLA vista en microscopía óptica 2x.

4.3.2 Ensayo de compresión

Las pruebas de la resistencia a la compresión del material BCP/PLA se desarrolló de forma uniaxial, perpendicular al plano de impresión. El esfuerzo de la compresión fue de 27.46 MPa. El comportamiento presentado por los andamios, de forma visual, fue plástico por la deformación irreversible sin fractura superficial, debido a la proporción de la matriz polimérica del material compuesto, figura 22 (Russias et al., 2007).

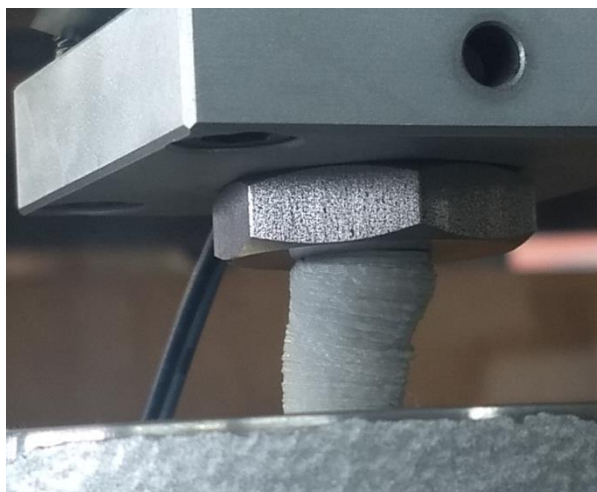


Figura 22. Probeta de BCP/PLA, en el ensayo de compresión.

4.3.3 MEB

En la micrografía del BCP/PLA con electrones secundarios se observó un enrejado uniforme, con algunos aglomerados esféricos de BCP dispersos en las capas, lo que indicó que el cerámico está embebido en el PLA; las líneas de construcción tuvieron adhesión entre las capas, con discontinuidades debido a la impresión 3D, figura 23a. El enrejado del andamio después del ensayo de compresión, figura 23b, mostró deformidades en el área de los orificios, en comparación con el andamio sin compresión, junto a aglomerados dispersos de BCP; las líneas de construcción presentaron deformidades en los bordes y fracturas locales.

Las microfracturas en las líneas de construcción con un aumento a x95, figura 24, se apreciaron con el esparcimiento continuo de los aglomerados esferoidales de BCP en el polímero, con presencia de rugosidad en la morfología de la superficie, probablemente por defectos en la impresión. En el mapeo de la muestra BCP/PLA se observó una distribución homogénea de agregados de BCP, en el PLA, mientras la línea de la fractura fue curva, se obtuvo la composición de C y O correspondiente al PLA; Ca, P y O para el BCP, con la distribución homogénea de los elementos en la región del análisis, por lo cual el andamio mantuvo el BCP inmerso en el PLA (Russias et al., 2007; Miao et al., 2008).

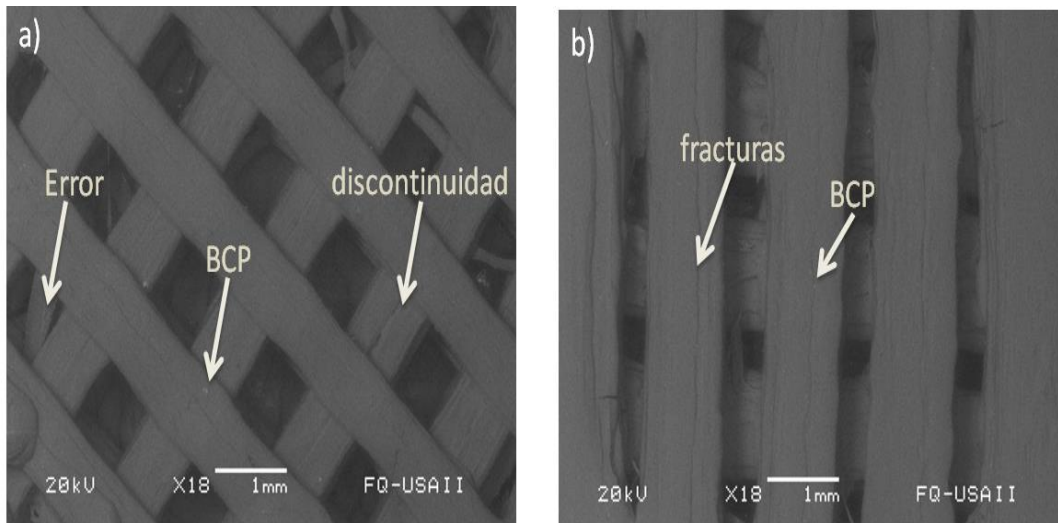


Figura 23. MEB del Enrejado del andamio a) al imprimir, b) con ensayo de compresión.

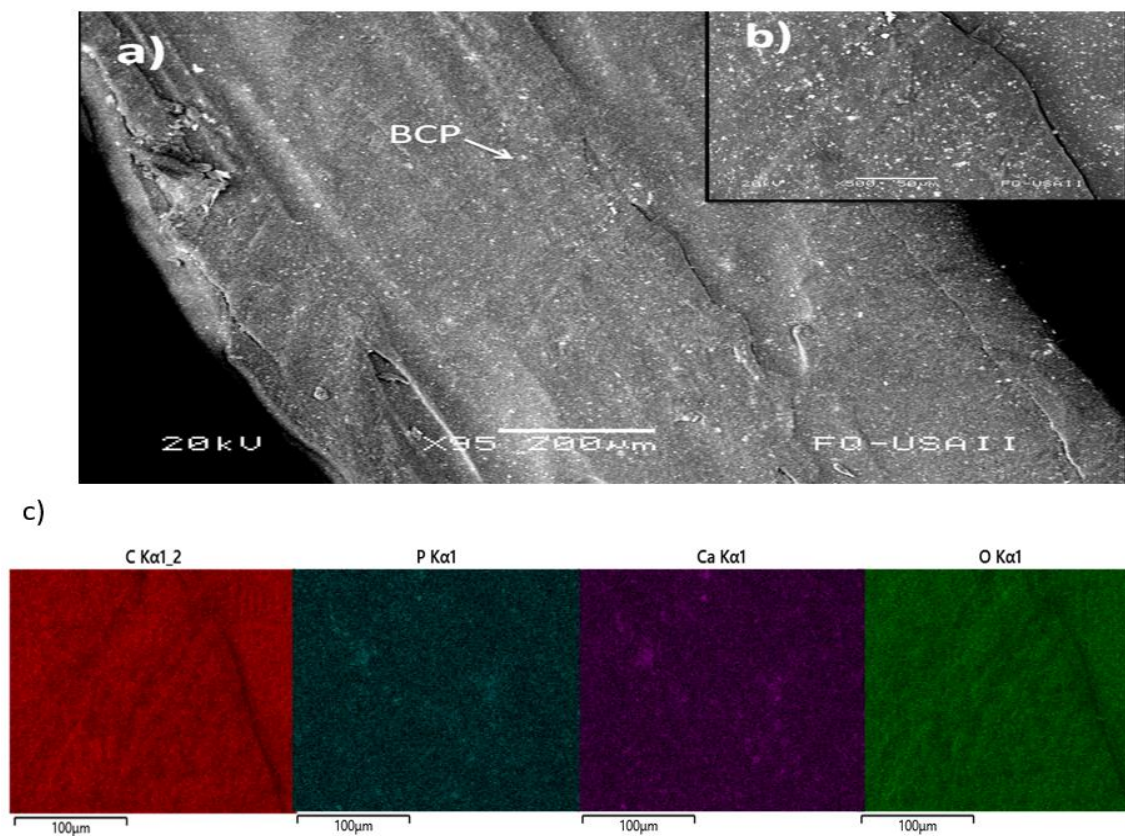


Figura 24. MEB de a) Línea de construcción del BCP/PLA de la probeta después del ensayo de compresión, b) aumento de la fractura de a, c) mapeo de la fractura en b, para detectar la presencia de elementos en la periferia de la fractura demostrada en 24b.

4.3.4. Prueba FCS

El material BCP/PLA se mantuvo en el FCS a una temperatura de 36.5 ± 1.5 °C, durante 3 semanas; la solución se renovó cada tres días. La superficie del material después del tiempo de incubación mantuvo la misma apariencia, como se muestra en la figura 25, sin cambios importantes en la estructura del andamio, después de la incubación.



Figura 25. Andamio húmedo con el FCS.

4.3.4.1 FT-IR

El análisis por FT-IR del andamio del BCP/PLA después de permanecer en el FCS, tuvo las bandas correspondientes de los grupos funcionales del cerámico y del polímero. En la figura 26 se muestran los espectros del andamio después de la inmersión en el FCS, el filamento y el material compuesto sin extrusión, en los cuales se observaron las señales correspondientes al PLA y al BCP, descritas en la sección 4.2.4.2 (pág. 43-44).

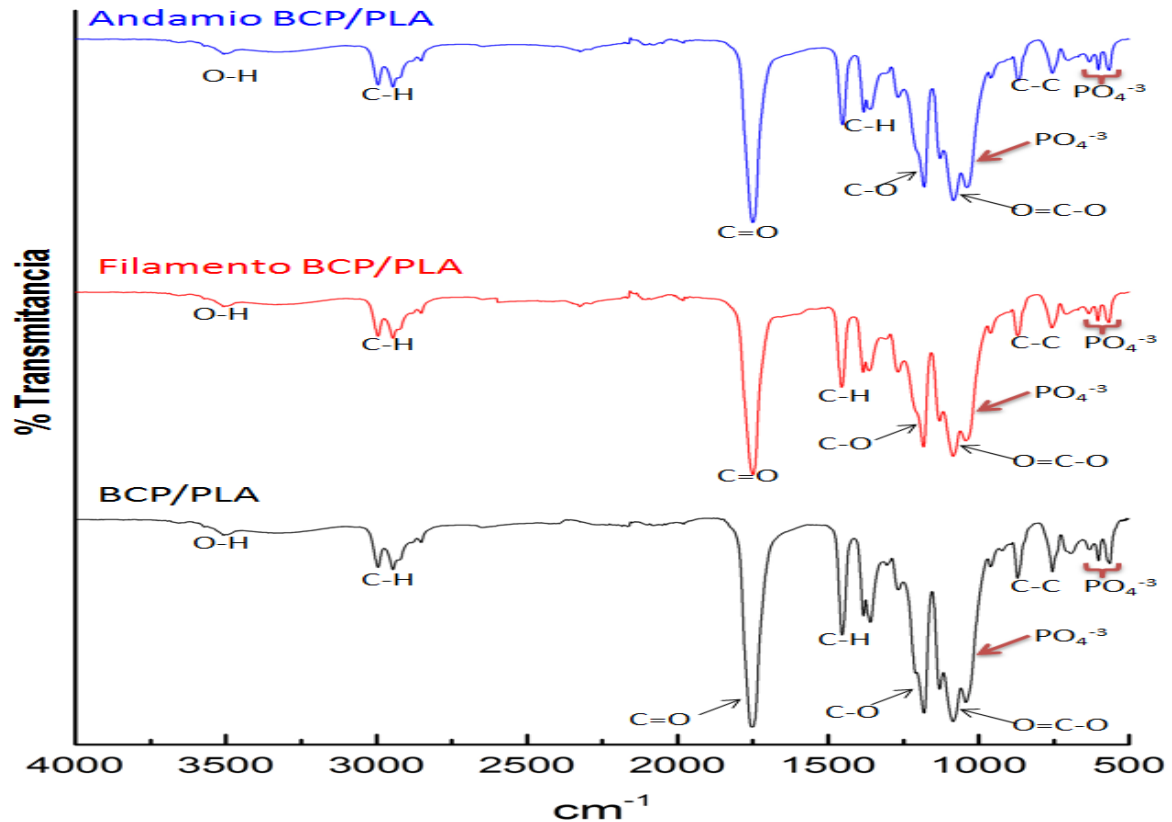


Figura 26. Seguimiento del material BCP/PLA por FT-IR.

El análisis de los espectros de IR, del material compuesto de BCP y PLA, la conformación del filamento y el andamio impreso por 3D inmerso en el FCS, mostró la integridad estructural del BCP, debido a la influencia de la temperatura durante los procesos extrusión de 150 °C y de la impresión de 230 °C. Comportamiento adecuado del BCP/PLA, dado que necesita soportar las condiciones de temperatura del cuerpo humano de 35 a 37 °C similares a las del tejido a regenerar, además de poseer un grado apropiado de degradación para asegurar la formación de tejido nuevo (Ochoa et al., 2015; Ferri et al. 2016).

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la síntesis del BCP, con una relación 70/30 de HAP/ β -TCP, el pH fue el factor determinante; para ver su influencia, se realizó el estudio de la proporción de las fases finales obtenidas, en función de las condiciones de la temperatura y el tiempo de cristalización, para lo cual éstas se fijaron, a 800 °C durante 2 h, como se muestra en la figura 27. De los datos obtenidos de la tabla 10 (Anexo III), se graficaron en las ordenadas las proporciones de HAP y el β -TCP en función del pH en el intervalo de 8 a 10; en donde se observó que, conforme aumentó el valor alcalino del pH hacia 10, se favoreció la formación de HAP, mientras que la fase de β -TCP disminuyó; este comportamiento fue similar al que obtuvieron Silva et al., 2016, en la síntesis de las fases individuales, para la HAP el pH fue mayor a 10, debido a la cantidad de iones OH^- presentes en el medio, mientras que alrededor de 6.5 se favoreció la formación del β -TCP.

En este trabajo hasta donde se tiene conocimiento es de los pocos, en donde se ha realizado la síntesis en un solo paso con la proporción 70/30, de HAP y β -TCP. La mezcla de fases con esta proporción del BCP deseada se obtuvo con un pH aproximado de 9, indicado por el cruce de la composición, en la figura 27. Mientras que, Baradaran et al., 2014, mencionaron que la obtuvieron a pH mayores a 10, región conocida para la síntesis de HAP. Y, en cuanto a las publicaciones de Jing et al., 2014 y Xidaki et al., 2018 el BCP lo obtuvieron a partir de la mezcla de HAP y β -TCP por separado.

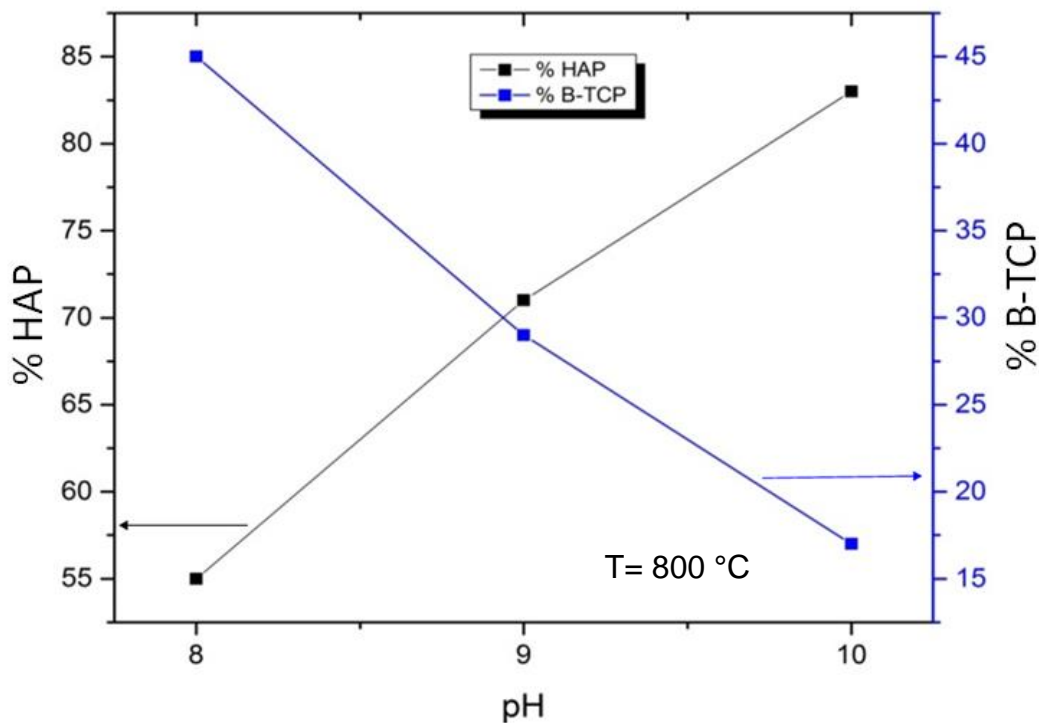


Figura 27. Proporción de la HAP y del β -TCP en función del pH.

El comportamiento de la síntesis del BCP a partir de los estudios preliminares de la tabla 10 (Anexo III), mostraron que no sólo estuvo en función del pH, sino también de la temperatura de cristalización, por la influencia en la obtención de la proporción de las fases, ya que a magnitudes menores a 700 °C se favorece la HAP y a arriba de los 900 °C la HAP se transforma al β -TCP. En la figura 28, se contemplan dos gráficos, en las ordenadas se encuentra el porcentaje de formación de HAP y β -TCP, mientras que, en las abscisas la temperatura de cristalización en el intervalo de 800-900 °C. Con la tendencia siguiente, en la figura 28a la proporción de la HAP en la bifase disminuyó, conforme la temperatura aumentó; en cambio, en la figura 28b, el contenido de β -TCP aumentó con el incremento de la temperatura. La HAP a 800 °C se obtuvo en una proporción del 55 %, mientras que el β -TCP de 45 %, en la bifase por lo cual fue necesario reducir la temperatura de cristalización a 750 °C para obtener la relación 70/30.

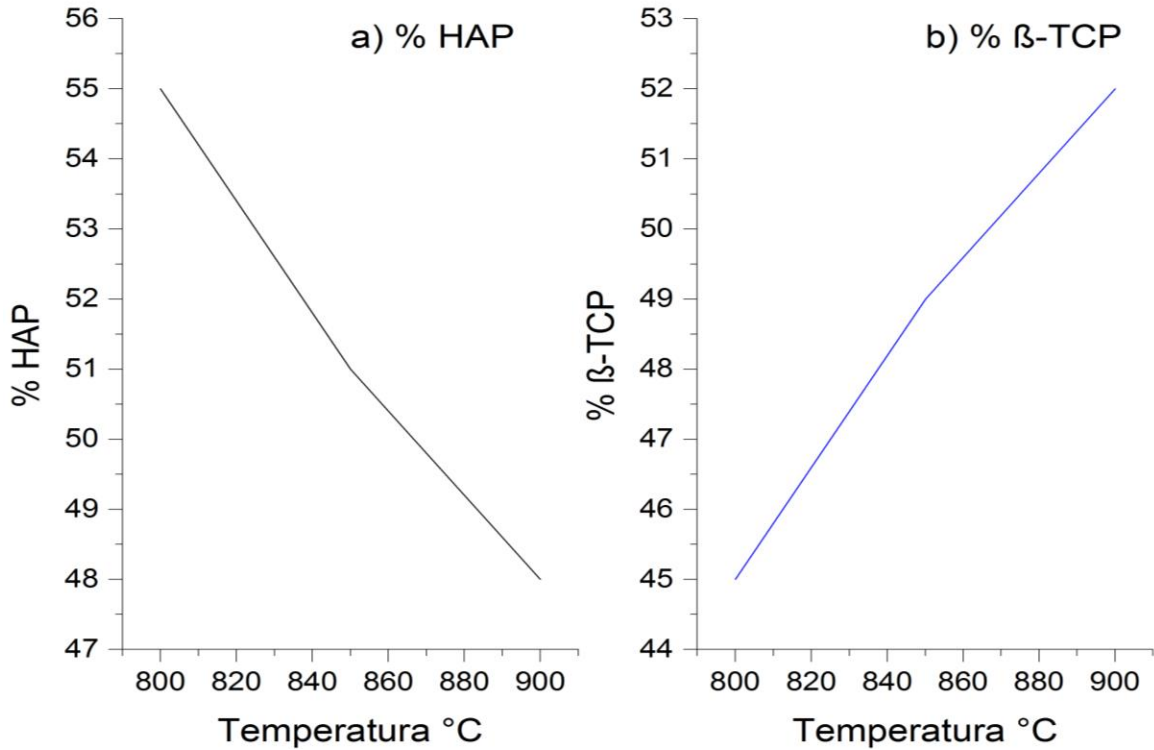


Figura 28. Gráficas de las proporciones del BCP respecto a la temperatura a) de la HAP y b) del β -TCP.

El tiempo de cristalización junto con la temperatura influyeron en el tamaño de partícula del BCP, como se detalla en la figura 29, construida con los datos de una muestra a 800 °C, obtenida cada 2 h hasta completar las 8 h de la tabla 10 (Anexo III). En donde el tamaño de la partícula cristalina aumentó con el incremento del tiempo de cristalización, lo que estuvo de acuerdo con Lio et al., 2008.

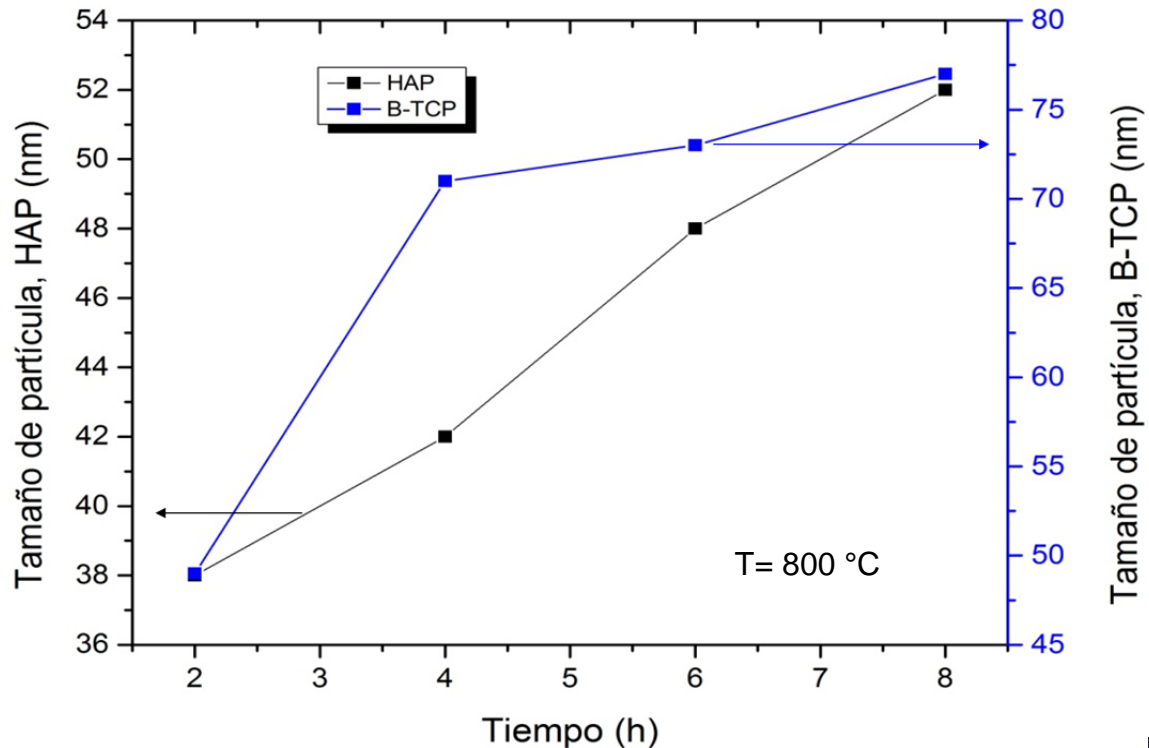


Figura 29. Tamaño de partícula de HAP y β -TCP, en función del tiempo de cristalización.

El cálculo del tamaño de partícula para el BCP fue para la HAP de 36.95 nm y del β -TCP de 51.33 nm. En el caso de la HAP el valor estuvo dentro del intervalo de Sadat et al., 2013, quienes consiguieron tamaños entre 15-45 nm por medio de la síntesis de coprecipitación. De forma semejante, para el β -TCP fue parecido al sintetizado por Massit et al., 2014 y Li et al., 2016, con magnitud entre 40-70 nm. Así, los valores del tamaño de partícula obtenidos, están de acuerdo con los estudios *in vitro* de Kim et al., 2016, usados para fomentar la regeneración ósea.

La morfología del BCP se ha relacionado con el método de síntesis, en el trabajo presente se obtuvo el BCP con una textura rugosa visualizada por MEB figura 12, este tipo de superficie se ha obtenido en las publicaciones de Kidaki et al., 2018; Montañez et al., 2018; Bleach et al., 2002, en sus resultados observaron que la superficie permite el alojamiento de las células en el material con una adhesión celular buena.

El material compuesto de BCP/PLA (10/90 %m/m) conformado por el método de emulsión doble, fue satisfactorio por la dispersión completa y homogénea del BCP en la matriz polimérica, debido a la evaporación total y cuidadosa del cloruro de metileno, a través del calentamiento a 75 °C, temperatura mayor a su punto de ebullición (40 °C); lo que se confirmó por el análisis FT-IR del material compuesto, el cual no presentó la interacción del enlace C-Cl entre 540 y 760 cm^{-1} del cloruro de metileno, identificando únicamente las señales correspondientes a la bifase del cerámico y al polímero. La eliminación del disolvente fue relevante, debido a las propiedades cancerígenas que podría producir en el organismo (Russias et al., 2006). La banda en 3300 cm^{-1} , se asoció a la presencia del agua adsorbida y no del alcohol polivinílico, debido a que el sólido BCP/PLA se lavó con suficiente agua, asegurando la eliminación completa del PVA utilizado como tensoactivo, además de que las señales de los enlaces O-H de los alcoholes, en espectroscopía infrarroja son anchas e intensas, en contraste con la de los obtenidos para el BCP/PLA.

Desde la comprensión de este trabajo, el éxito en la formación de las microesferas de BCP/PLA de tamaño menor a 10 μm , a una concentración de PLA al 4 %, verificado por el análisis de MEB, figura 15, tamaño similar a la de las fibras de colágeno que fomenta la bioactividad del material en el hueso de acuerdo a Sadat et al., 2013. Esta dimensión para la misma concentración de PLA fue menor a las que consiguieron Qui et al., 2000 y Russias et al., 2006 de 50 a 100 μm , y por Du et al., 2013, entre 150 y 650 μm . Lo que permitió una distribución homogénea de las microesferas del BCP en la matriz del PLA; y, favoreció la extrusión del material compuesto a 150 °C (Esposito et al., 2017), figura 16, sin afectar la composición y la distribución química del filamento de BCP/PLA.

El filamento homogéneo sin defectos facilitó la impresión 3D de la probeta del andamio de BCP/PLA. Ésta se probó con el ensayo de compresión, obteniendo una resistencia de 27.46 MPa, valor adecuado para su uso como sustituto de hueso esponjoso, ver tabla 5. El comportamiento mecánico de la superficie del andamio, de forma visual, mostró un comportamiento plástico por la deformación

irreversible, debida a la cantidad del polímero mayor que la del cerámico; mientras las microfracturas observadas podrían deberse a las líneas de construcción, o bien a los aglomerados del BCP de acuerdo con Torres et al., 2013. El valor de la resistencia de compresión comparada con la impresión de las pastas de BCP 50/50 fue mayor a la que realizaron Castilho et al., 2014, con un valor de 2 MPa, y también lo fue respecto a otra de sus muestras de HAP con aglutinante polimérico 60/40 por impresión 3D de 21 MPa.

En el caso de la prueba de degradación del BCP/PLA a las 3 semanas de inmersión en el FCS, no presentó residuos de ácido láctico en el fluido, de acuerdo a los resultados por FT-IR, a diferencia del material compuesto HAP/PLA, 50/50 de Segura et al., 2018, en los cuales el polímero se degradó en 72 h. La degradación hidrolítica del polímero forma productos ácidos, lo que causa reacciones corporales adversas de acuerdo a Russias et al., 2007, el BCP en la matriz polimérica es un medio amortiguador ya que disminuye la liberación de productos ácidos (Russias et al., 2007).

La arquitectura del andamio de BCP/PLA obtenido en este trabajo está compuesta por las tres estructuras deseadas. La macro relacionada con la formación de la probeta por impresión 3D con estructura controlada y regular, de acuerdo a Torres et al., 2013; Cox et al., 2015; Castilho et al., 2014, lo que contribuye a mejorar las propiedades mecánicas comparado con otros métodos de fabricación de andamios. La micro emula la porosidad del andamio, debido a que Babilotte et al., 2019; Chia y Wu, 2015; Bittner et al., 2019, en sus estudios *in vivo*, sugirieron que interviene en, la penetración celular, el flujo de los fluidos y la vascularización, propiedades esenciales para el biomaterial. La nanoarquitectura alcanzada en este trabajo fue de composición similar al tejido óseo, proporcionada por el BCP en la matriz polimérica de PLA, acorde a Jing et al., 2014; Xidaki et al., 2018; Logesh et al., 2019, quienes realizaron investigaciones de fosfatos de calcio de HAP y β -TCP *in vitro*, concluyendo que este tipo de materiales permiten la adhesión celular y la fijación de proteínas, lo que provee bioactividad en el implante. La estructura en conjunto que conforma la arquitectura del andamio, es

la adecuada para un prospecto de implante que fomente la regeneración ósea para la sustitución parcial de hueso esponjoso similares a los producidos por Castilho et al., 2014; Kaavessina et al 2015; Logesh et al., 2019.

La metodología desarrollada para la bifase BCP, 70/30, HAP/ β -TCP en una etapa de síntesis es simple y eficiente en comparación con la de aquellos estudios en donde obtienen los fosfatos de calcio de forma individual para después realizar la mezcla. Adicionalmente, permite la reproducibilidad de las condiciones a diferencia de las metodologías de Xu et al., 2017; Tan et al., 2013; Silva et al., 2016, las cuales se probaron experimentalmente en este trabajo sin obtener reproducibilidad.

En este trabajo, hasta donde se tiene conocimiento, la investigación es escasa en cuanto a la impresión 3D de los andamios de BCP/PLA, por deposición fundida; en otros trabajos se han realizado con proporciones en porcentaje peso y técnicas diferentes como inyección por moldeo de β -TCP/PLA, 30/70 (Ferri et al., 2016), el electro hilado de HAP/PLA, 25/75 (Kim et al., 2016), la reproducción de espuma de HAP/ β -TCP con PVA, 80/20 entre otras. La investigación sobre la impresión 3D de andamios por deposición fundida, se ha realizado a partir de HAP/PLA, 50/50 (Juárez, 2018), e inclusive con el β -TCP/PLA, 20/80 (Babilotte et al., 2019); así que, no hay publicaciones (Babilotte et al., 2019; Ho et al., 2016) realizadas de BCP con PLA en proporción 10/90.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación, se obtuvo una metodología reproducible para la síntesis del cerámico BCP, HAP/ β -TCP en proporción 70/30, con una pureza mayor al 99 % y un tamaño de partícula mixto, para la HAP de 36.95 nm y la de β -TCP de 51.33 nm, por el método de coprecipitación a partir del estudio del pH de síntesis y la temperatura y tiempo de cristalización.

La metodología conseguida por el método de doble emulsión permitió la obtención de microesferas de 10 μ m para la integración homogénea del BCP/PLA, en la matriz del polímero. Esta continuidad microestructural del material compuesto influyó en la formación de filamentos de 1.75 mm sin huecos, ni defectos, idóneo para la impresión 3D.

Los andamios producidos de BCP/PLA por la técnica de impresión 3D, proporcionaron una resistencia a la compresión de 27.46 MPa, comparable con la del hueso esponjoso, eficaz en el uso de implantes de regeneración ósea. Con una comportamiento plástico por la deformación irreversible influenciado por la matriz polimérica.

La caracterización de la composición química de BCP y PLA; la homogeneidad de la cerámica en el polímero y, la forma del espécimen, fueron comprobadas para cada caso.

En la investigación realizada en este proyecto se desarrolló la metodología reproducible para la síntesis, conformación e impresión 3D de los andamios de BCP/PLA, para comprobar su aplicación como biomaterial de regeneración ósea, es necesario continuar la investigación, por lo que se sugieren los estudios siguientes:

- ✚ Analizar el material compuesto y el polímero por calorimetría diferencial de barrido, para determinar el comportamiento del PLA en el andamio.

- ✚ Las pruebas de resistencia a la tensión de la probeta y la determinación del módulo de Young de las muestras del material compuesto BCP/PLA, para complementar las propiedades mecánicas.
- ✚ Realizar las pruebas de viabilidad celular, para conocer el crecimiento celular en el andamio.
- ✚ Realizar el mapeo de MEB en aproximadamente 50 puntos de la muestra del BCP, para obtener la relación Ca/P promedio.
- ✚ Analizar la degradación del andamio por MEB, para el seguimiento del cambio de rugosidad en la superficie, como el cambio de pH en la disolución.

ANEXOS

ANEXO I. Síntesis preliminares de BCP

Las pruebas preliminares se realizaron con una relación de Ca/P, tiempo de añejamiento y temperatura de síntesis iguales, la variación de condiciones únicamente fue en pH, temperatura y tiempo de cristalización, como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de síntesis preliminares.

<i>Muestra</i>	Síntesis	Cristalización	
	pH	Temperatura, °C	Tiempo, h
BCP-1	10	900	14
BCP-2	10	900	2
			4
			6
			8
			10
			12
BCP-3	10	800	2
			4
			6
			8
		900	1
BCP-4	8	800	2
		850	1
		900	0.5
BCP-5	9	800	2
		850	1
BCP-6	9	800	1
			2
		750	2

ANEXO II. Reactivos utilizadas en el FCS

Tabla 7. Orden y cantidades de reactivos utilizadas en el FCS (Kokubo y Takadama, 2006; Segura et al., 2018).

Orden	Reactivo	Cantidad	Pureza %
1	NaCl	8.035 g	99.5
2	NaHCO ₃	0.355 g	99.5
3	KCl	0.225 g	99.5
4	K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	0.231 g	99.0
5	MgCl ₂ *6H ₂ O	0.311 g	98.0
6	HCl 1M	39 mL	----
7	CaCl ₂	0.292 g	95.0
8	NaSO ₄	0.072 g	99.
9	Tris	6.118 g	99.0
10	HCl 1M	0-5 mL	----

ANEXO III. Proporciones obtenidas

Las proporciones obtenidas de HAP/ β -TCP, fueron las siguientes: 50/50, 60/40, 70/30, 80/20 y 90/10, según sus análisis de DRX y de FT-IR. En la tabla 8; se resumen las condiciones de los resultados obtenidos en la síntesis del BCP.

Tabla 8. Proporciones del BCP.

Proporción HAP/ β -TCP	pH	Temperatura de cristalización, °C	Tiempo de cristalización, h
50/50	8	800	2
60/40	8	850	1
70/30	9	750	2
80/20	9	800	2
90/10	10	800	4

El análisis de identificación por DRX del BCP de la tabla 8 se muestra en la figura 30. En la identificación del BCP se determinaron las fases, de hidroxiapatita, y β -fosfato tricálcico, figura 30.

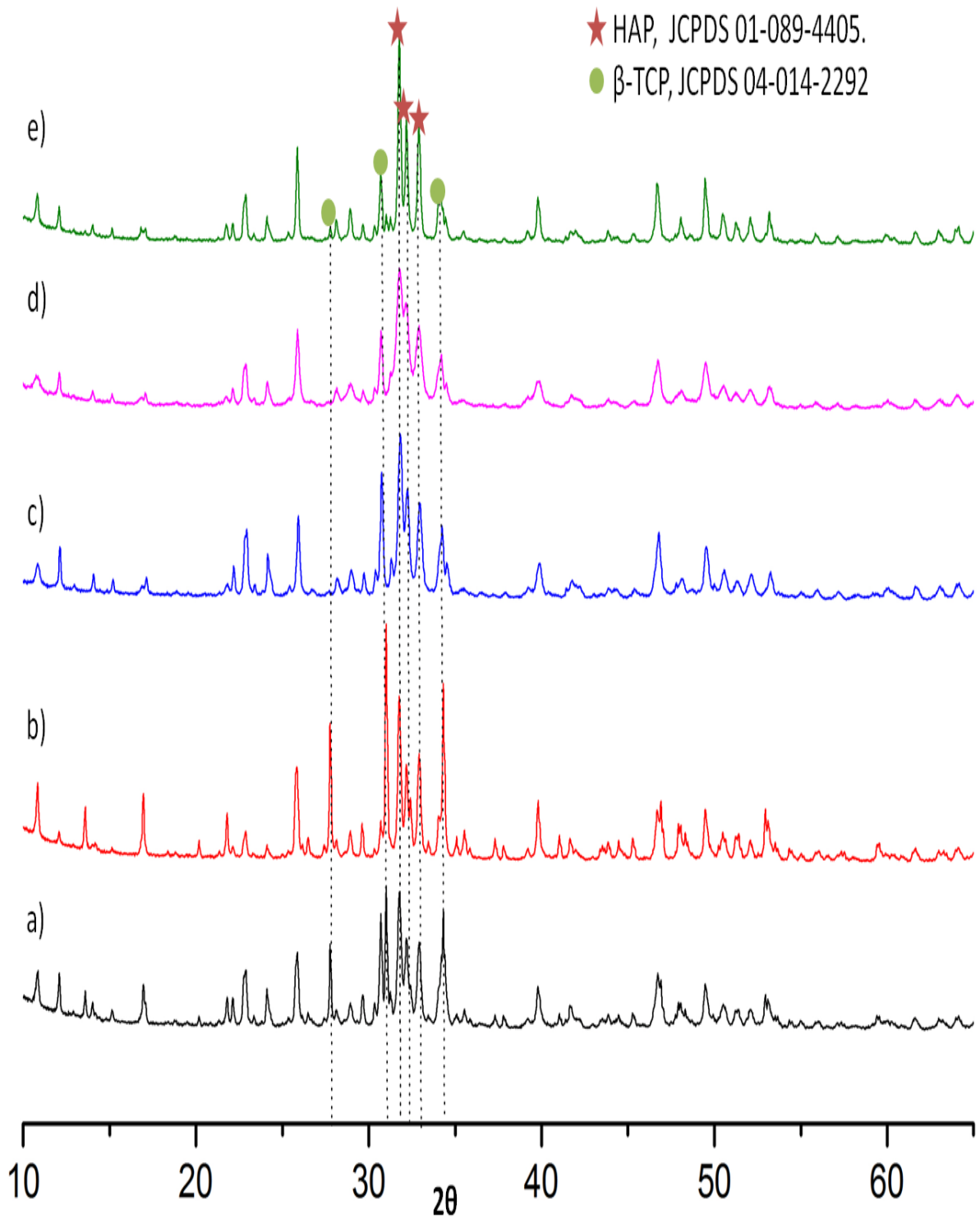


Figura 30. Patrones de DRX del BCP con las siguientes proporciones de HAP y β -TCP respectivamente a) 50/50, b) 60/40, c) 70/30, d) 80/20 y e) 90/10 sintetizado por coprecipitación.

El tamaño de partícula promedio del BCP fue mixto, por la presencia de las dos fases, para cada proporción, se determinó el tamaño; el de la HAP varió entre 31 a 44 nm, mientras para el β -TCP fue de 51 a 71 nm, como se observa en la tabla 9.

Tabla 9. Tamaño de partícula del BCP en función de su proporción HAP/ β -TCP.

Proporción HAP/β-TCP	Tamaño de partícula, nm (HAP/β-TCP)
50/50	40/66
60/40	42/64
70/30	37/51
80/20	31/58
90/10	44/71

En el BCP, la obtención de las dos fases, fue confirmado por el análisis de FT-IR, lo que corroboró los datos de DRX, figura 31. Las señales fueron atribuidas a la presencia de HAP y β -TCP, de acuerdo a la descripción de la sección 4.1.2 (pág. 37).

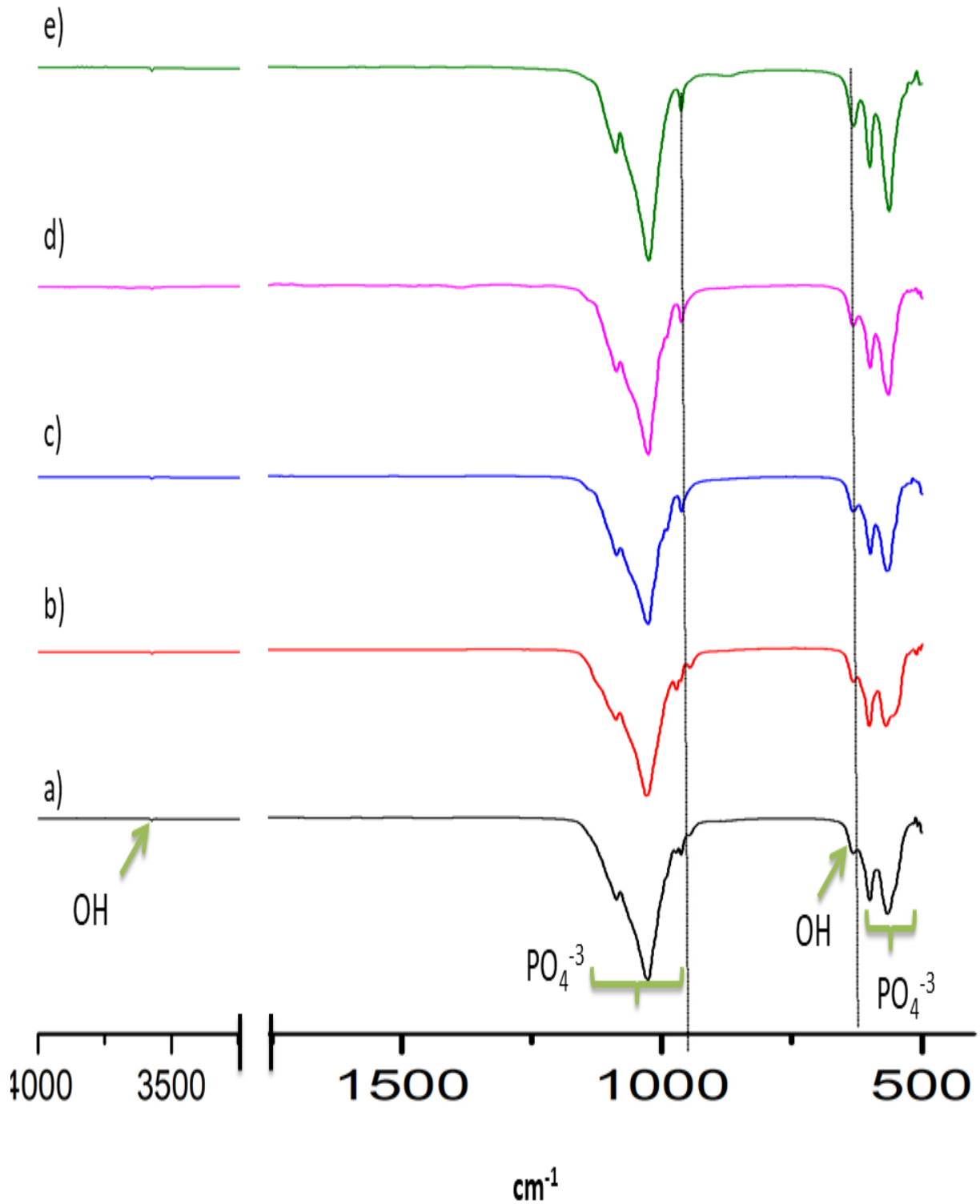


Figura 31. Espectros de infrarrojo de BCP con base en HAP y β -TCP respectivamente a) 50/50, b) 60/40, c) 70/30, d) 80/20 y e) 90/10.

Los resultados de las condiciones preliminares de tamaño de partícula y proporción de la tabla 6 (Anexo I), se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Proporciones obtenidas en las síntesis preliminares.

Muestra	Síntesis	Cristalización		Resultados	
	pH	Temperatura °C	Tiempo h	Proporción HAP/β-TCP	Tamaño de partícula HAP/β-TCP, nm
BCP-1	10	900	14	70/30	158/177
BCP-2	10	900	2	77/23	58/66
			4	89/11	62
			6	88/12	66/103
			8	90/10	103/115
			10	80/20	115/185
			12	79/21	115/132
BCP-3	10	800	2	83/17	38/49
			4	90/10	42/71
			6	85/13	48/73
			8	87/13	52/77
		900	1	85/15	66/54
BCP-4	8	800	2	55/45	40/66
		850	1	51/49	42/62
		900	0.5	58/42	54/66
BCP-5	9	800	2	71/29	46/62
		850	1	77/23	33/52
BCP-6	9	800	1	78/24	35/53
			2	80/20	31/58
		750	2	70/30	37/51

ANEXO IV. Productos académicos

- ✚ Reyes B., Juárez D. y Chávez M. (2018). Estudio de las condiciones para la síntesis de la hidroxiapatita y el β-fosfato tricálcico. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*, 4, 365-370.
- ✚ Chávez M. y Reyes B. (2019). Síntesis por coprecipitación del bifosfato de calcio con base en hidroxiapatita y β-fosfato tricálcico, en proceso de publicación.

Estudio de las condiciones para la síntesis de la hidroxiapatita y el β -fosfato tricálcico

Reyes Santoyo Ana Belen*, Juárez Robles Diana Elizabeth, Chávez García María de Lourdes

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Laboratorio de Cerámica. Av. Universidad 3000, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México. C.P. 04510, México.

*Autor para correspondencia: anna-reyes@live.com.mx

Recibido:
13/mayo/2018

Aceptado:
27/julio/2018

Palabras clave:
Hidroxiapatita,
 β -fosfato tricálcico

Keywords:
Hydroxyapatite,
 β -tricalcium phosphate

RESUMEN

El propósito de este estudio es encontrar las condiciones de síntesis reproducibles para obtener una HAP y un β -TCP, de fase única, con una pureza >99% y, de tamaño de partícula entre 20 y 60 nm; debido a la falta de congruencia en los procedimientos. El estudio se desarrolló, por el método de co-precipitación, con el control y la variación de las condiciones de reacción, de añejamiento y de cristalización. El seguimiento de los resultados se hizo por IR-TF y DRX. Los resultados para el β -TCP, mostraron la fase bifásica formada por β -TCP, con una cantidad mínima de HAP. En el caso de la HAP se estableció una metodología reproducible, para una pureza mayor al 99%, un tamaño 31.86 nm; similar a 35.54 nm a una, de tipo bovino. La HAP funcional sintetizada se usará en el diseño de andamios bioactivos mediante la impresión 3D para regeneración del tejido óseo.

ABSTRACT

The aim of this study is obtain reproducible synthesis conditions for the HAP and the β -TCP, as unique phase, with a purity >99% and particle size of 20-60 nm; due to incongruence in procedures. The study was performed with the co-precipitation method, varying the conditions of reaction, aging and crystallization. The XRD and FT-IR were used to follow the procedures. The synthesis results of β -TCP showed a biphasic phase formed with β -TCP and a minimum amount of HAP. In the case of the HAP, a reproducible methodology was established, with a purity >99% and size of 31.86 nm, similar to one bovine of 35.54 nm. The HAP functional synthesized will be used in the design of bioactive scaffolds by printing 3D for bone tissue regeneration.

Introducción

Los fosfatos de calcio son los biocerámicos, responsables de la resistencia a la compresión y la rigidez, en los huesos. Forman aproximadamente el 70% del peso seco, de los mismos (Eliaz y Metoki, 2017; Narayanan et al., 2016). Los cuales, están formados por: la hidroxiapatita (HAP), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, con una relación Ca/P de 1.67 y el β -fosfato tricálcico (β -TCP), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, con Ca/P de 1.5.

La hidroxiapatita (HAP) se obtiene de forma natural, a partir de los huesos del cóndilo de origen bovino, se ha usado como biomaterial, en implantes; y, sirve como punto de comparación para las hidroxiapatitas sintéticas (Narayanan et al., 2016). Los procesos de obtención, de la HAP bovina, son complicados, requieren de lavados con HCl o, temperaturas de 600°C para eliminar la materia orgánica, seguido de temperaturas de cristalización de 700 a 1000°C, con costos elevados (Londoño et al., 2016). Por ello, la síntesis de la HAP y el β -TCP es de interés científico, por su preparación sencilla y, por sus aplicaciones tecnológicas como biomateriales. Las rutas de síntesis ensayadas incluyen: el método cerámico, el mecanoquímico, la combustión, el de sol-gel, el hidrotermal, las micro-emulsiones y la co-precipitación, siendo esta última, la que ofrece sencillez de síntesis, con pureza y rendimientos mayores al 99% y, control del tamaño de partícula, menor a los 100 nm (Eliaz y Metoki, 2017; Lee et al., 2016). Como es el caso de la HAP, con estas características necesarias para su integración, con polímeros para la impresión de andamios de biomateriales, en la sustitución de tejido óseo (Kim et al., 2016; Juárez et al., 2017).

Las investigaciones de la HAP, por el método de co-precipitación, no coinciden, debido a que cada autor presenta sus condiciones, de tal manera que entre ellos varían en intervalos amplios; se describen tiempos de reacción, desde 1 hasta 3 h, con temperaturas desde 50 hasta 80°C y, pH de 7 a 11; en cuanto a los tiempos de añejamiento para la obtención de un precipitado uniforme van de 1 a 14 días; y, con temperatura de cristalización, desde los 600 hasta 1000°C, con tiempos de 1 a 48 h (Luo et al., 2015; Suksomran y Molloy, 2017). Esta falta de uniformidad en las metodologías, con diferencias amplias en sus condiciones, falla al intentar reproducirlas.

El β -TCP se ha sintetizado por estado sólido a partir, del fosfato de dihidrógeno anhidro (CaHPO_4), denominada monetita, la que se obtiene del fosfato de dihidrógeno

dihidratado, o brushita a través, de ser secada a 105°C, 2 h para su posterior almacenamiento hasta la reacción, con el CaCO_3 , para su cristalización, a los 900°C, el tamaño de partícula del producto es del orden micrométrico (Jinlong et al., 2001). Debido a que, la β -TCP es requerida de tamaño nanométrico para las aplicaciones biomédicas, la síntesis, por el método de co-precipitación es una opción; la cual, requiere de un control cuidadoso de las condiciones, desde la estequiometría, la temperatura, el tiempo y el pH de reacción, así como de sus condiciones de añejamiento y cristalización; una variación ligera de éstas, ha sido publicado que, genera cambios en la composición final del producto, dando las fases de pirofosfato de calcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) o la HAP (Eliaz y Metoki, 2017). El sistema binario $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$, que incluye H_2O (Anexo, Figura 5) y, del cual se parte para la síntesis, ha demostrado de forma teórica que, el β -TCP no se obtiene de forma directa, en un paso. Las investigaciones han sugerido, que el orden de precipitación es, a través, del fosfato apatítico tricálcico, con una relación Ca/P de 1.5, $[\text{Ca}_3(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_2\text{OH}]$ y, a partir de éste, su transformación al β -TCP arriba de los 900°C. La mayoría de las publicaciones mencionaron la obtención de la fase bifásica constituida, por el β -TCP y la HAP (Dorozhkin, 2016; Owen et al., 2017); algunas cuantas, mencionaron que consiguieron la fase pura (Ghosh y Sarkar, 2016; Lee et al., 2016).

Este estudio surge, de un trabajo previo, en donde se tuvo la necesidad de contar con fases puras para ser usadas en el diseño de andamios bioactivos para la regeneración ósea (Juárez et al., 2017). Por lo que el propósito de este estudio es encontrar las condiciones de síntesis de la HAP y del β -TCP, como fase única, una pureza >99% y, un tamaño de partícula nanométrico entre los 20 y 60 nm. De tal forma que, la metodología sea reproducible, para su posterior integración, con polímeros y, su conformación en andamios, por impresión 3D, para la obtención de biomateriales, en la regeneración ósea. Los parámetros de la síntesis a variar serán, la temperatura, el tiempo y el pH de la reacción, así como la temperatura y el tiempo de añejamiento y, de cristalización. Este proceso se seguirá, por medio de las técnicas de caracterización de difracción de rayos X de polvos (DRX), espectroscopía de absorción infrarroja por transformada de Fourier (IR-TF) y, el cálculo del tamaño de partícula por la ecuación de Scherrer.

Como referencia especial útil en el presente trabajo se incluye la figura 1, que muestra el diagrama de fases de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ con H_2O .

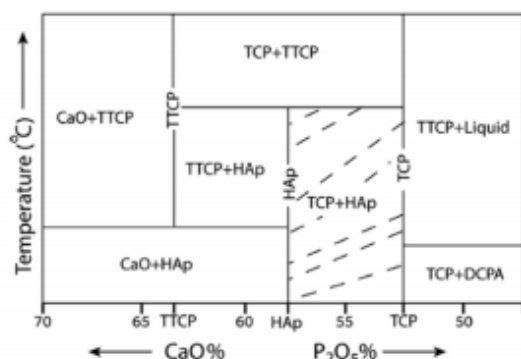


Figura 1. Equilibrio de fases de CaO-P₂O₅ con H₂O, la región sombreada, muestra la fase bifásica del fosfato de calcio HAP con β-TCP (Eliaz y Metoki, 2017).

Metodología

Reactivos

Nitrato de calcio tetrahidratado, Ca(NO₃)₂·4H₂O, de APLL Engineered Materials, inc., pureza 99.95%. El fosfato de amonio dibásico, (NH₄)₂HPO₄, pureza 99.98% y el hidróxido de amonio, NH₄OH, al 28.49%, de J.T. Baker, C.

Equipo

Difracción de rayos X de polvos (DRX)

La caracterización de las fases se realizó, en un difractómetro Siemens D5000, radiación de CuK_{α1} filtrada con Ni, λ= 1.5406 Å, con una constante de tiempo de 0.4 y constante de paso angular de 0.02, a 30 Kv y 25 mA, de 10° a 65° de 2θ.

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (IR-TF)

La caracterización de grupos funcionales, se analizaron en un equipo Fourier, Bruker Vector 22FTIR, en el infrarrojo medio de 4000 a 400 cm⁻¹.

Tamaño de partícula

La determinación del tamaño de partícula se realizó, por medio de la ecuación de Scherrer, con base en el difractograma de rayos X. En donde, se midió el ancho, a la mitad de la señal con intensidad mayor, por medio de la ecuación siguiente: (Hruschka et al., 2017).

$$T = \frac{\lambda * 0.89}{\beta \cos \theta}$$

Donde: λ= longitud de onda de rayos X; β= la intensidad de la señal mayor; θ= ángulo de Bragg; = tamaño del cristal.

Síntesis de HAP

La HAP se sintetizó a partir de las disoluciones de Ca(NO₃)₂·4H₂O y (NH₄)₂HPO₄, con la adición por goteo, de la primera, a la segunda, con agitación constante, en intervalos de pH de 7 a 11, de 35 a 65°C, de 20 min a 3 h; al finalizar la adición, la reacción se dejó en reposo, 24 h. El sólido formado se filtró y lavó con H₂O destilada, con posterior secado a 80°C y, su cristalización se realizó de 600 a 1000°C, de 8 a 24 h. Las muestras se realizaron por quintuplicado para reproducir las condiciones de síntesis.

Síntesis de β-TCP

El β-TCP se sintetizó a partir de la adición de la disolución de Ca(NO₃)₂·4H₂O, por goteo, a la de (NH₄)₂HPO₄, con agitación constante, a un pH de 7, a 45°C, por 3 h; con posterior reposo, durante 24 h. El producto se separó y lavó con H₂O destilada, se secó a 80°C y, su cristalización a 900°C, durante 14 h.

Resultados y discusión

Síntesis

Hidroxiapatita, HAP

La HAP pura se sintetizó por el método de co-precipitación, los resultados de este estudio presentan el esfuerzo final para encontrar, las condiciones de síntesis necesarias para reproducir la HAP pura. Debido a, la falta de consenso en las metodologías propuestas, por autores distintos (Hruschka et al., 2017; Luo et al., 2015; Suksomran y Molloy, 2017).

En este estudio, las condiciones de síntesis reproducibles para elaborar una HAP pura fueron: la temperatura de reacción a 65°C; ya que, a una temperatura mayor, el agua inicia su evaporación, por consiguiente se tiene una disminución del volumen, con la pérdida del control del pH; con un tiempo de reacción de 3h; y, con un control del pH de 10 a 11, debido a que, si es menor a 10 se produce la HAP con mezcla del β-TCP, en coincidencia con

otro trabajo (Hruschka et al., 2017). El tiempo mínimo de añejamiento para la precipitación del sólido fue de 24 h. La cristalización fue a 700°C, durante 14 h, ya que, a una temperatura menor a ésta, la fase no se obtiene y, con una, mayor a los 1000°C, la β -TCP inicia su formación (Suksomran y Molloy, 2017; Luo et al., 2015).

La síntesis por quintuplicado de la HAP garantizó la reproducibilidad, de las condiciones para obtener, con una pureza >99%, sin fases adicionales y, de tamaño nanométrico, de 31.86 nm, similar a la HAP-B de 35.54 nm en coincidencia con otros trabajos (Narayanan et al., 2016; Luo et al., 2015). Lo cual, permite una HAP funcional para su integración con polímeros, en la producción de biomateriales compuestos, para su conformación en andamios por impresión 3D y su aplicación, en la regeneración ósea (Kim et al., 2016).

β -fosfato tricálcico, β -TCP

Las condiciones de síntesis para obtener, una β -TCP como fase única, fueron controladas cuidadosamente. Para lo cual se probaron condiciones diferentes, como fueron: la temperatura de reacción de 35, 45 y 50°C, con tiempos de 1 a 3 h y, el pH de 7 a 11; añejamiento por 24 h; y, la cristalización, desde los 700 hasta 1000°C y de 3 hasta 14 h.

Se puede asumir que fue posible establecer las condiciones de síntesis del β -TCP a 35°C, durante 3 h a un pH de 7; con un añejamiento a 22°C, por 24 h y, una cristalización a 900°C, durante 14 h. Los resultados del producto, por DRX y confirmados por IR-FT, mostraron la formación de la fase bifásica, con la obtención del β -TCP y una cantidad mínima de HAP (Figura 3 y 4); con tamaño de partícula nanométrico. Por lo que, para obtener un β -TCP puro. Algunos autores sugieren mantener el pH, entre 6 y 7, evitando la formación de otras fases, entre ellas la HAP. La relación Ca/P precisa en 1.5, un cambio ligero del 1% podría generar fases secundaria, una variación mayor ha mostrado la formación de la HAP; y una, menor, al $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (Ebrahimia et al., 2017). El añejamiento, se ha relacionado, con el tiempo necesario para la formación del β -TCP; algunos autores mencionaron que, a un tiempo mayor de 24 h, la relación de Ca/P aumentó, relacionado a la producción de la HAP. El tiempo y la temperatura de cristalización, tienen una influencia directa en el tamaño de partícula (Eliazy Metoki, 2017).

Difracción de rayos X de polvos

La caracterización del cerámico por DRX confirmó la formación de la HAP como una fase pura, similar a la de la HAP-B.

Hidroxiapatita, HAP

El análisis de la HAP, por DRX determinó una fase, sin adicionales, identificada como hidroxiapatita pura, al igual que la HAP-B, Figura 2.

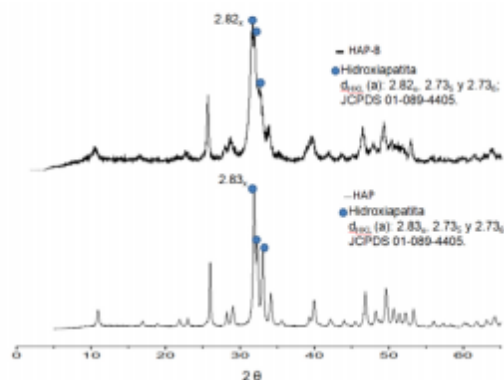


Figura 2. Difractograma de RX de la HAP sintética y, la HAP-B de origen bovino.

β -fosfato tricálcico, β -TCP

En el difractograma de DRX para el β -TCP, se observó la formación de la fase bifásica, constituida, por el β -TCP en proporción mayor y, la segunda por, a la HAP, Figura 3.

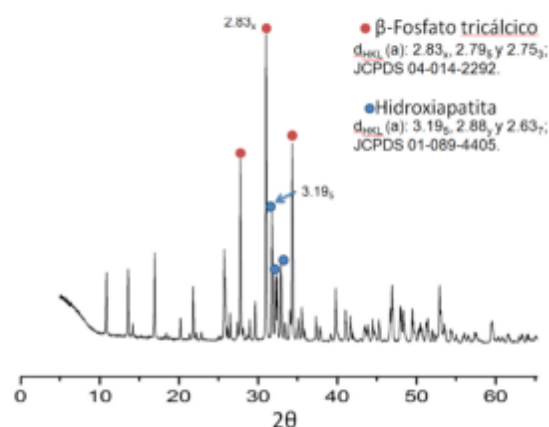


Figura 3. Patrón de DRX del β -TCP sintético.

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Hidroxiapatita, HAP

El análisis del espectro, de IR-FT para la HAP y la HAP-B, mostró las señales en 730 y 1000 cm^{-1} , relacionadas a los

modos de tensión asimétricos del enlace P-O; mientras que, en 580 cm^{-1} se identificó la vibración de flexión del enlace O-P-O. En la HAP-B se apreciaron bandas similares, que en la HAP, a excepción de la, de 3570 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de estiramiento del enlace O-H estructural y las, adicionales en 1400 y 800 cm^{-1} se atribuyeron a la señal de estiramiento del C-O, lo que sugirió la presencia de carbonatos, debida a la exposición atmosférica, una vez purificada (Ebrahimia et al., 2017), Figura 4.

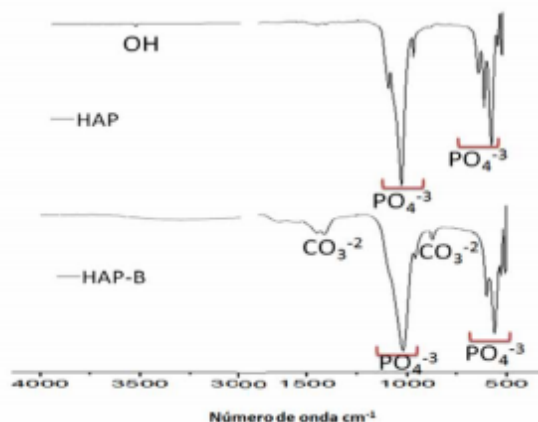


Figura 4. Espectro de IR-TF de la HAP sintética y la HAP-B, de origen bovino.

***β*-fosfato tricálcico, β-TCP**

El espectro de IR-TF, del β-TCP, mostró para las bandas en $580\text{-}680$ y 1000 cm^{-1} , correspondieron a los modos de vibración de estiramiento simétricos, asociados a los PO_4^{3-} , característicos del β-TCP, a diferencia de los asimétricos de la HAP; lo cual se ha explicado, por el cambio de vibración, debida a la mezcla de fosfatos, del β-TCP y de la HAP (Ca/P entre 1.5 y 1.67, respectivamente). Las bandas en 800 y 1100 cm^{-1} , se correlacionó a la vibración de estiramiento del enlace P-O. La señal en 3500 cm^{-1} asociada a la vibración del enlace O-H, de la HAP, no se apreció; algunos autores, lo han atribuido a que, el β-TCP está en una proporción mayor, en la fase bifásica (Owen et al., 2017; Ebrahimia et al., 2017), Figura 5.

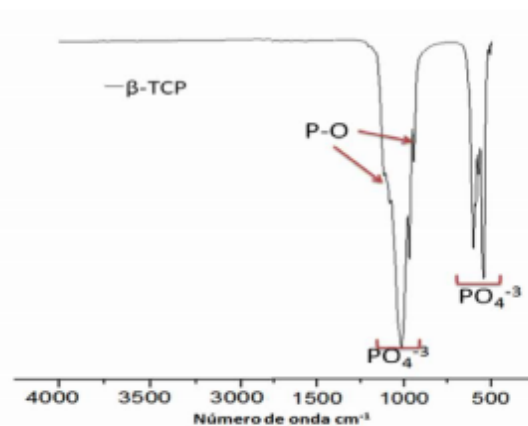


Figura 5. IR-TF del β-TCP sintético.

Tamaño de partícula

Hidroxiapatita, HAP

El tamaño de partícula de la HAP dio un valor de 31.86 nm y, para la HAP-B, de 35.54 nm , (Kim et al, 2016).

***β*-fosfato tricálcico, β-TCP**

El tamaño de partícula para el β-TCP fue de 51.33 nm , para la HAP de 61.59 nm .

Conclusiones

En este estudio, se obtuvo una HAP con una pureza mayor al 99% y, un tamaño de partícula de 31.86 nm ; con características similares a las, de la HAP-B, de 35.54 nm . Para su integración con polímero, en la conformación de biomateriales compuestos, por impresión 3D para ser usado en la regeneración ósea. La HAP pura se sintetizó, a través del estudio de las condiciones de síntesis; estableciendo una metodología reproducible. Así como, su confirmación, con su análisis por IR-TF; con la señal en 3500 cm^{-1} del O-H estructural, en coincidencia con la de otros autores (Dorozhkin, 2016; Ebrahimia et al., 2017).

La síntesis del β-TCP, por el método de co-precipitación, proporcionó una mezcla con HAP en una cantidad mínima; con tamaño de partícula promedio de 51.33 nm , conforme a los resultados en IR-TF y DRX. La eliminación de la HAP se realizará por medio del control del pH, entre 6 y 7; una relación Ca/P de 1.5; probando tiempos de añejamiento menor a las 24 h; y control de la temperatura de cristalización.

Agradecimientos

Al financiamiento del proyecto PAIP 5000-9038 de la Facultad de Química, UNAM. Las autoras agradecen las facilidades del Laboratorio del Dr. David Díaz de la Facultad de Química, UNAM; a la M en C. Cecilia Salcedo (USAI, Facultad de Química, UNAM). Al Dr. Epifanio Cruz Zaragoza, por proporcionar la muestra de HAP-B (IIN, UNAM).

Bibliografía

- Dorozhkin S. (2016). Multiphasic calcium orthophosphate (CaPO₃) bioceramics and their biomedical applications. *Ceramics International*. 6: 6529-6554.
- Ebrahimia M., Botelho M., Dorozhkin S. (2017). Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Materials Science and Engineering*. 71: 1293-1312.
- Eliaz N., Metoki N. (2017). Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials*. 10: 334.
- Ghosh R., Sarkar R. (2016). Synthesis and characterization of sintered beta-tricalcium phosphate: A comparative study on the effect of preparation route. *Materials Science and Engineering*. 67: 345-352.
- Hruschka V., Tangl S., Ryabenkova Y., Heimel P., Barnewitz D., Möbus G., Keibl C., Ferguson J., Quadros P., Miller C., Goodchild R., Austin W., Redl H., Nau T. (2017). Comparison of nanoparticulate hydroxyapatite pastes of different particle content and size in a novel scapula defect model. *Scientific Reports*. 7: 43425.
- Jinlong N., Zhenxi Z., Dazong J. (2001). Investigation of Phase Evolution During the Thermochemical Synthesis of Tricalcium Phosphate. *Journal of Materials Synthesis and Processing*. 9: 235-245.
- Juárez D., Salas S., García T., Chávez M. (2017). Síntesis de nano-hidroxiapatita por los métodos sol-gel y co-precipitación. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*. ISSN: 2448-6663.
- Kim H., Lee H., Knowles J. (2016). Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration. *Journal of Biomaterials*. A: 643-649.
- Lee D., Pai Y., Chang S., Kim DH. (2016). Microstructure, physical properties, and bone regeneration effect of the nano-sized β -tricalcium phosphate granules. *Materials Science and Engineering*. 58: 971-976.
- Londoño S., Ramirez C., Real A., Rubio E., Rodríguez M. (2016). Study of bovine hydroxyapatite obtained by calcination at low heating rates and cooled in furnace air. *Journal of Materials Science*. 51: 4431-4441
- Luo J., Chen J., Wenzhao L., Zhiliang H., Chen C. (2015). Temperature Effect on Hydroxyapatite Preparation by Co-precipitation Method under Carbamide Influence. *EDP Sciences*. 26: 1004-1007
- Narayanan G., Vernekar V., Kuyinua E., Laurencin C. (2016). Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopedic regenerative engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 107: 247-276.
- Owen R., Dard M., Larjava H. (2017). Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. *Journal of medical Materials*. doi: 10.1002/jbm.b.34049.

Síntesis por coprecipitación del bifosfato de calcio con base en hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico

Chávez García María de Lourdes*, Reyes Santoyo Ana Belen

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Departamento Química Inorgánica y Nuclear
Av. Universidad N° 3000, Coyoacán, Ciudad de México, 04510. México.

*Autor para correspondencia: marilu@unam.mx

Recibido:
8/agosto/2019

Aceptado:

Palabras clave:
Bifosfato de calcio
HAP/ β -TCP
coprecipitación

Keywords:
Biphasic calcium
phosphate
HAP/ β -TCP
co-precipitation

RESUMEN

El propósito de este estudio fue encontrar las condiciones de síntesis para obtener el BCP con base en HAP y β -TCP para una relación 70/30 respectivamente, con tamaño de partícula inferior a 60 nm. La síntesis se llevó a cabo por el método de coprecipitación con la variación del pH, la temperatura y el tiempo de cristalización. Los resultados mostraron la obtención de HAP/ β -TCP desde 50/50 hasta 90/10, lo que se corroboró DRX y FTIR. El pH de la síntesis y la temperatura de cristalización influyeron en la proporción de las fases; mientras el tiempo de cristalización, en el tamaño de partícula. El BCP, 70/30, de HAP/ β -TCP, se sintetizó a un pH de 9 y temperatura de cristalización de 750 °C, por 2 h, con un tamaño de partícula, para la HAP de 37 nm y del β -TCP de 51 nm, aptos para su uso como biomaterial de regeneración ósea.

ABSTRACT

The aim of this study was to find the synthesis conditions to obtain BCP, based on HAP and β -TCP for a relationship of 70/30 respectively and with a particle size less than 60 nm. The synthesis was carried out by co-precipitation method, varying the pH, crystallization temperature and time. Results showed HAP/ β -TCP from 50/50 to 90/10 was obtained, which was corroborated by DRX and FTIR. The pH of the synthesis and the crystallization temperature influenced in proportion of the phases; while the crystallization time in the particle size. The BCP, 70/30 of HAP/ β -TCP, was synthesized with pH of 9 and crystallization temperature of 750 °C for 2 h, with a particle size for HAP of 37 nm and β -TCP of 51 nm, suitable for use as a bone regeneration biomaterial.

Introducción

Los implantes de regeneración ósea para aplicaciones dentales, ortopédicas, y de reconstrucción maxilofacial son objeto de estudio en la búsqueda de biomateriales que cumplan las características de composición y propiedades mecánicas semejantes al tejido a sustituir o regenerar. En el caso de la sustitución temporal del hueso han surgido los fosfatos de calcio como la hidroxiapatita, HAP, de fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y el β -fosfato tricálcico, β -TCP, $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, los cuales son componentes que simulan la composición inorgánica del hueso natural. La HAP con una relación Ca/P de 1.67 se asocia a la formación y la fijación ósea, mientras que el β -TCP con una Ca/P de 1.5 promueve la regeneración ósea (Logesh et al, 2019; Ebrahimi et al, 2017; Tang et al, 2016).

La HAP y el β -TCP se combinan en proporciones diferentes, dando lugar al bifosfato de calcio, BCP, éste provee de estabilidad al implante con respecto al uso de las cerámicas individuales; con las ventajas adicionales de biocompatibilidad, biodegradabilidad y bioactividad (Logesh et al, 2019; Tang et al, 2016).

Una relación de fases ideal estándar en el BCP ha sido difícil de establecer, ya que, al comparar los estudios diferentes se ha observado el uso de contenidos variables de HAP/ β -TCP desde 50/50 hasta 90/10, además su empleo ha sido en animales diversos y partes del cuerpo distintas; por ello la investigación de andamios HAP/ β -TCP es escasa (Prezas et al, 2017; Ebrahimi et al, 2017; Liu et al, 2008). No obstante, el BCP en 70/30 de HAP/ β -TCP ha sido de interés debido a que la hidroxiapatita se encuentra en cantidad mayor en el organismo y aumenta la actividad celular (Ebrahimi et al, 2017; Liu et al, 2008). La relación Ca/P de la bifase influye en el comportamiento biológico del organismo (Ebrahimi et al, 2017), cuando tiene un valor de 1.6, con HAP dominante, ha presentado una bioactividad en los fluidos mayor, respecto a relaciones menores a 1.5 y mayores a 2; debido al control de la solubilidad del cerámico ya que la HAP genera biocompatibilidad, mientras el β -TCP la biodegradación del implante (Shim et al, 2017).

La bioactividad del BCP no influye, únicamente en la proporción utilizada de HAP/ β -TCP, sino, en el tamaño de partícula en donde la matriz extracelular de los tejidos u órganos naturales requiere de dimensiones, por debajo de los 60 nm para que proporcione una actividad biológica, parecida a la de los tejidos a sustituir (Gong et al, 2015).

La síntesis de los fosfatos de calcio para obtener productos de tamaño nanométrico, se ha realizado por metodologías distintas, como son el estado sólido, la mecanosíntesis, el sol-gel y la coprecipitación; esta última en comparación con los otros métodos es amigable, con el ambiente y produce un rendimiento mayor al noventa por ciento, con partículas de tamaño nanométrico entre 8 y 80 nm (Kaavessina et al, 2015; Juárez et al, 2017).

Las metodologías publicadas del BCP por el método de coprecipitación, con una relación Ca/P fija, varían en intervalos de pH de 8 a 11; las temperaturas y los tiempos de cristalización van desde los 700 a 900°C y de 2 a 8 h, respectivamente (Luo et al, 2015; Ebrahimi et al, 2017).

El objetivo de este estudio fue encontrar las condiciones de síntesis del BCP a fin de obtener una metodología reproducible, para la proporción 70/30 de HAP/ β -TCP, con un tamaño de partícula menor a 60 nm. Las variables estudiadas para encontrar las condiciones que influyeron en el proceso de obtención de la bifase, fueron el pH de la síntesis, la temperatura y el tiempo de cristalización. El seguimiento del proceso se realizó, por medio de las técnicas de caracterización de difracción de rayos X de polvos (DRX), espectroscopía de absorción infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y el cálculo del tamaño de partícula por la ecuación de Scherrer.

Metodología

La síntesis del BCP se realizó a partir del método de coprecipitación, en el cual se mantuvo fija la relación Ca/P inicial de 1.61, variando el pH, la temperatura y el tiempo de cristalización, con la finalidad de obtener productos de tamaño nanométrico y observar la tendencia de la proporción de la bifase respecto a los cerámicos individuales.

Reactivos

Nitrato de calcio tetrahidratado, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, pureza 99.95%. Fosfato de amoniodibásico, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, pureza 99.98%, P.M.132.063 g/mol. Hidróxido de amonio, NH_4OH , 28.49%, P.M. 38.049 g/mol.

Equipo

Difracción de rayos X de polvos (DRX)

La caracterización de las fases se realizó, en un difractómetro Siemens D5000, radiación de $\text{CuK}\alpha$ filtrada con Ni , $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$, con una constante de tiempo de 0.4s, una constante de paso angular de 0.02 a 30 Kv y 25 mA, de 10° a 70° de 2θ .

Tamaño de partícula

La determinación del tamaño de partícula se realizó, por medio de la ecuación de Scherrer, a partir del difractograma de rayos X. En donde se midió el ancho a la mitad de la señal de intensidad mayor, con la ecuación siguiente: (Hruschka et al., 2017)

$$\tau = \frac{\lambda \cdot 0.89}{\beta \cos \theta}$$

Donde: λ es la longitud de onda de rayos X; β , la intensidad de la señal mayor; θ , ángulo de Bragg; τ , tamaño del cristal.

Espectroscopía de absorción infrarroja (FTIR)

La identificación de los modos de vibración, de los compuestos, se efectuó en un equipo Fourier, Bruker Vector 22FTIR, en el infrarrojo medio de 4000 a 400 cm^{-1} .

Síntesis de bifosfato de calcio, BCP

En las síntesis del BCP, para obtener una relación 70/30 de HAP/ β -TCP, se inició con las pruebas preliminares a partir de una proporción molar fija de 1.61, a través de la adición, de 107 mL de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 M, por goteo y agitación constante, a 166 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.08 M; terminada la adición, se ajustó y controló el pH de 8 a 10, con NH_4OH y la temperatura, desde 45 a 55°C, durante 3 h; al término de este tiempo, se reposo, por 24 h para la filtración posterior y lavado del sólido, con H_2O destilada; el producto se secó,

aproximadamente 24 h. Finalmente, se probaron las temperaturas y los tiempos de cristalización desde 750 a 900°C y desde 1 hasta 8 h, respectivamente, tabla 1

Tabla 1. Condiciones de las pruebas preliminares con una proporción molar fija de 1.61.

pH	Temperatura de cristalización (°C)	Tiempo de cristalización(h)
10	900	1
		2
		4
		6
	800	2
		4
6		
8		
8	800	2
	850	1
9	750	2
	800	2
		1
	850	1

Resultados

Los resultados obtenidos a partir de la relación Ca/P 1.61, en función de la variación del pH, con la temperatura y el tiempo de cristalización, produjo las proporciones de HAP/ β -TCP, siguientes: 50/50, 60/40, 70/30, 80/20 y 90/10 según sus análisis de DRX y de FTIR. En cuanto a la temperatura de síntesis y el tiempo de añejamiento fueron obtenidos en estudios previos (Reyes et al., 2018; Juárez et al., 2017).

DRX

La identificación del BCP se realizó por el análisis de su difractograma de rayos X, en el cual se determinaron dos fases, la primera en proporción mayor como hidroxapatita, JCDPS 01-089-4405 ($d_{\text{hkl}}(\text{a})$: 3.195, 2.887 y 2.637) y la segunda como β -fosfato tricálcico, JCDPS04-014-2292 ($d_{\text{hkl}}(\text{a})$: 2.834, 2.795 y 2.753), figura 1, la proporción final del BCP fue estimada con el programa Match! asistido por FullProf.

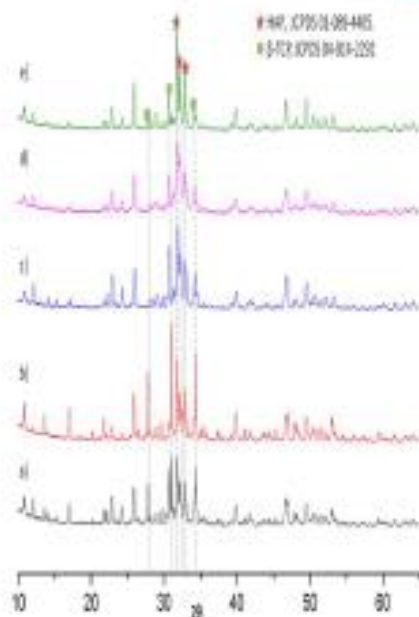


Figura 1. Patrones de DRX del BCP para las relaciones: HAP/ β -TCP a) 50/50, b) 60/40, c) 70/30, d) 80/20 y e) 90/10.

Tamaño de partícula

El tamaño de partícula promedio del BCP fue mixto por la presencia de las dos fases, para cada proporción se determinó el tamaño; el de la HAP varió entre 31 a 44 nm, mientras para el β -TCP fue de 51 a 71 nm como se observa en la tabla 1.

Tabla 2. Tamaño de partícula del BCP en función de su proporción HAP/ β -TCP.

Proporción HAP/ β -TCP	Tamaño de partícula, HAP/ β -TCP (nm)
50/50	40/66
60/40	42/64
70/30	37/51
80/20	31/58
90/10	44/71

FTIR

El análisis del espectro del BCP, por FTIR, mostró las señales asociadas a los grupos funcionales presentes en la HAP y el β -TCP,

figura 2 (Logesh et al., 2019; Ebrahimi et al., 2017; Tang et al., 2016).

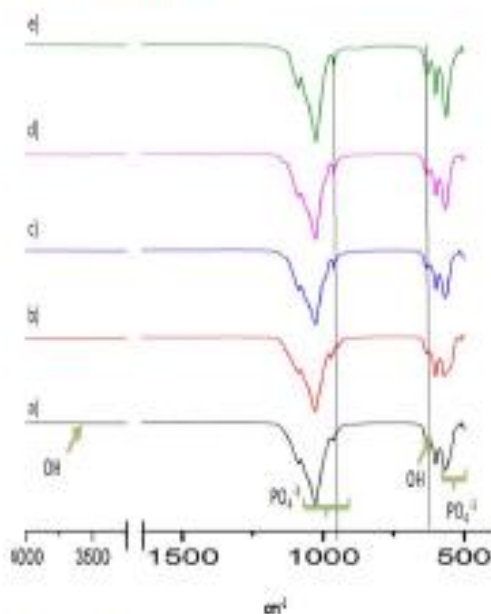


Figura 2. Espectros de FTIR de BCP, con relaciones: HAP/ β -TCP a) 50/50, b) 60/40, c) 70/30, d) 80/20 y e) 90/10.

El análisis de FTIR corroboró los datos de DRX, en la obtención de las dos fases del BCP; las señales en 3590 y en 680 cm^{-1} fueron relacionadas al estiramiento del hidroxilo, OH estructural de la HAP, cuando esta fase se encuentra en cantidades significativas en la mezcla, llega a ser visible, debido a que el tamaño de la banda es pequeño y de intensidad baja (Montañez et al., 2018). La banda presente en 947 cm^{-1} al igual que la identificada en 650 cm^{-1} fueron atribuidas al estiramiento simétrico de los PO_4^{3-} , característicos del β -TCP. La banda en 580 cm^{-1} se relacionó al modo de vibración simétrico del O-P-O; y, las señales de 1000 y 1100 cm^{-1} se correlacionaron a la vibración de estiramiento asimétrico del enlace P-O (Ebrahimi et al., 2017; Tang et al., 2016).

Discusión

Las condiciones reproducibles de coprecipitación en la obtención de la proporción 70/30 de HAP y β -TCP fueron: la temperatura de síntesis de 45 a 55 $^{\circ}\text{C}$ con un

tiempo de reacción de 3 h, el pH de 9 y el tiempo de añejamiento para la precipitación del sólido fue de 24 h y la temperatura de cristalización de 750°C durante 2 h. La obtención del BCP se realizó de forma quintuple, garantizando la reproducibilidad del método con productos de pureza mayor al 95% y tamaño de partícula menor a 60 nanómetros.

El estudio de las variables tanto de la síntesis, como de la cristalización en la obtención del BCP 70/30, de HAP/ β -TCP, dieron por resultado otras proporciones, representadas en la tabla 3.

Tabla 3. Proporciones obtenidas en la síntesis del BCP.

Proporción HAP/ β -TCP	pH	Temperatura de cristalización (°C)	Tiempo de cristalización (h)
50/50	8	800	2
60/40	8	850	1
70/30	9	750	2
80/20	9	800	2
90/10	10	800	4

La caracterización, de HAP y β -TCP de la bifase, por DRX, mostró cambio en la intensidad de las señales principales, relacionadas a la variación del contenido de cada una de las fases, como se observa en la figura 1.

En la síntesis del BCP, el pH fue determinante, para la obtención de la proporción 70/30 HAP/ β -TCP. Para ver la influencia del pH en la proporción de las fases obtenidas se realizó un estudio variando el pH desde 8 hasta 10, a 800°C, durante 2 h, figura 3. En donde, la ordenada muestra la obtención de HAP y β -TCP en función de la variación del pH; en la gráfica se analizó que, conforme aumentó el valor alcalino del pH se favoreció la formación de HAP, mientras que la fase de β -TCP disminuyó. Esto, corroboró que el pH de síntesis para la obtención de HAP es mayor a 10 (Luo et al., 2015) y para el β -TCP a un pH menor a 8, debido a la cantidad de iones OH⁻ presentes en el medio (Silva et al., 2016). El cruce de composición indicó que la síntesis de la BCP, 70/30, de HAP y β -TCP, es a un pH aproximado de 9, adecuado para obtener la proporción deseada.

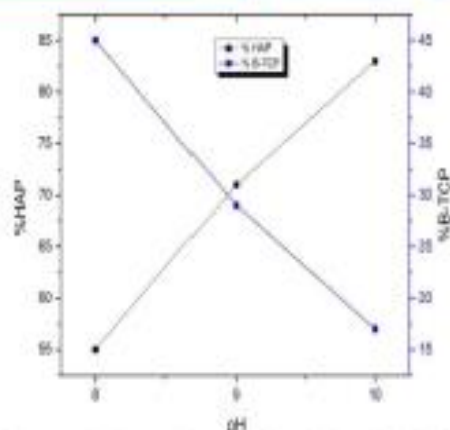


Figura 3. Dependencia de la HAP y del β -TCP respecto al pH de síntesis, a 800°C, 2 h.

El comportamiento de las fases del BCP, no sólo, estuvo en función del pH, también lo fue de la temperatura de cristalización. En la figura 4, se muestra en la ordenada el porcentaje de formación de HAP y β -TCP, mientras en la abscisa, la temperatura de cristalización, en un intervalo de 800-900 °C; en donde el comportamiento observado fue el siguiente: el contenido de β -TCP aumentó con el incremento de la temperatura, en tanto la HAP disminuyó. La temperatura de cristalización de 750 °C fue la adecuada para obtener la proporción 70/30 para el BCP.

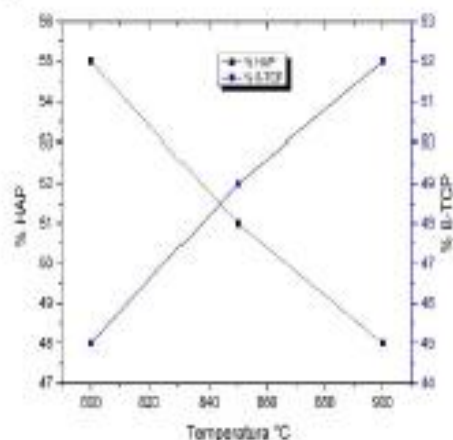


Figura 4. Proporción de la HAP y del β -TCP en función a la temperatura de cristalización.

La influencia del pH con respecto a la formación de las fases del BCP, tuvo un efecto mayor que, la temperatura de cristalización, como se muestra en las figuras 3 y 4, en las cuales se contempla el aumento o disminución promedio de fases, HAP y β -TCP.

El tiempo de cristalización a diferencia de la temperatura, influyó en el tamaño de partícula del biocerámico. En la figura 5 se observa para, una muestra estudiada a 800°C, la variación del tiempo de cristalización, cada 2 h hasta las 8 h. La tendencia encontrada fue el aumento del tamaño de partícula, de las fases del BCP, en función del incremento del tiempo de cristalización; y, en función de su relación Ca/P, de acuerdo con otro trabajo (Liu et al., 2008). En el caso de este estudio, se partió de la relación 1.61 para, favorecer la proporción 70/30.

El tamaño de partícula mixto para el BCP, 70/30, fue similar al de la HAP y el β -TCP individuales. En el caso de la HAP se obtuvo en la síntesis un valor de 37 nm, dentro del intervalo de 15-45 nm; publicada para una HAP sintetizada por el mismo método (Sadat et al., 2013); al igual que, el β -TCP de 51 nm, con magnitud similar a la de otros autores, de 40-70 nm (Massit et al., 2014; Li et al., 2016). Se confirma que, los valores de tamaño de partícula obtenidos en la síntesis son apropiados para la regeneración ósea en biomateriales (Kim et al., 2016).

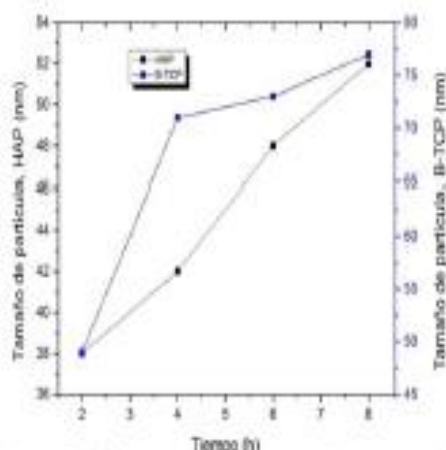


Figura 5. Influencia del tiempo en el tamaño de partícula de HAP y β -TCP en el BCP.

Conclusiones

En este estudio, se obtuvo el cerámico BCP con proporción 70/30 de HAP/ β -TCP, por el método de coprecipitación. La metodología fue reproducible, con pH de 7 y temperatura de cristalización de 750 °C durante 2 h. Se obtuvo con las características siguientes: pureza mayor al 99%; tamaño de partícula mixto, para la HAP de 37nm y la del β -TCP de 51 nm, lo cual es apto para su uso como biomaterial de regeneración ósea.

A partir de la variación de las condiciones experimentales, tanto del pH de la síntesis, como de la temperatura de cristalización, se determinó su influencia en el contenido de la proporción del BCP; desde la 50/50, hasta la 90/10, de HAP/ β -TCP. Mientras que, el tiempo de cristalización influyó en el tamaño de partícula. Los resultados se confirmaron con DRX y FTIR.

Agradecimientos

Se agradece a la Facultad de Química, UNAM, el financiamiento del Proyecto 5000-9038, PAIP y por la beca otorgada a la alumna A. Belen Reyes S., del Subprograma 127, Formación de Investigadores. Las autoras agradecen a la M. en C. Cecilia Salcedo y a la Q. Maricela Gutiérrez, de la USAI, Facultad de Química, UNAM.

Referencias

- Ebrahimi M., Botelho M., Dorozhkin S. (2017). Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Materials Science and Engineering*, 71: 1293-1312.
- Gong T., Xie J., Liao J., Zhang T., Lin S., Lin Y. (2015). Nanomaterials and bone regeneration. *Bone Research*, 3: 1-7.
- Hruschka V., Tang S., Ryabenkova Y., Heimel P., Barnewitz D., Möbus G., Keibl C., Ferguson J., Quadros P., Miller C., Goodchild R., Austin W., Redl H., Nau T. (2017). Comparison of nanoparticulate hydroxyapatite pastes of different particle content and size in a novel scapula defect model. *Scientific Reports*, 7: 1-11.

Juárez D., Salas S., Chávez M., García T. (2017). Síntesis de nano-hidroxiapatita por los métodos sol-gel y coprecipitación. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*, 3: 406-412.

Kaavessina M., Chafidz A., Ali I., Al-Zahrani S. (2015). Characterization on poly(lactic acid)/hydroxyapatite prepared by a solvent blending technique: viscoelasticity and in vitro hydrolytic degradation. *Journal of elastomers and plastics*, 47, 753-768.

Kim H., Lee H., Knowles J. (2016). Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration. *Journal of Biomaterials*, 79A: 643-649.

Li H., Xue F., Wan X., Liu H., Bai J., Chu C. (2016). Polyethylene glycol-assisted preparation of beta-tricalcium phosphate by direct precipitation method. *Powder Technology*, 301: 255-260.

Liu H., Yazici H., Ergun C., Webster T., Bermek H. (2008). An in vitro evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 4: 1472-1479.

Logesh M., Marimuthu A., Ballamurugan A. (2019). Fabrication of graphene incorporated biphasic calcium phosphate composite and evaluation of impact of graphene in the in-vitro biomineralization process. *Materials Chemistry and Physics*, 232: 75-81.

Luo J., Chen J., Wenzhao L., Zhiliang H., Chen C. (2015). Temperature Effect on Hydroxyapatite Preparation by Co-precipitation Method under Carbamide Influence. *EDP Sciences*, 26: 1004-1007.

Massit A., Yacoubi A., Idrissi C., Yamni K. (2014). Synthesis and characterization of nano-sized β -Tricalcium phosphate: Effects of the aging time. *Journal of Applied Chemistry*, 7: 54-61.

Montañez N., Estupiñán H., García S., y Peña D. (2018). Fabrication and characterization of novel biphasic calcium phosphate and nanosized hydroxyapatite derived from fish otoliths in different composition ratios. *Chemical Engineering Transactions*, 64: 307-312.

Prezas P., Melo B., Costa L., Valente M., Lança M., Ventura J., Pinto L., Graça M. (2017). TSDC and impedance spectroscopy measurements on hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate and hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate biphasic bioceramics. *Applied Surface Science*, 424: 28-38.

Reyes B., Juárez D., Chávez M. (2018). Estudio de las condiciones para la síntesis de la hidroxiapatita y el β -fosfato tricálcico. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*, 4: 365-370.

Sadat M., Khorasani M., Dinpanah E., Jamshid A. (2013). Synthesis methods for nano sized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, 9: 7591-7621.

Silva S., Lima S., Guilhen S., Courrol L., Bressiani (2016). Evaluation of europium-doped HA/ β -TCP ratio fluorescence in biphasic calcium phosphate nanocomposites controlled by the pH value during the synthesis. *Journal of Luminescence*, 180: 177-182.

Shim K., Kim S., Yun Y., Jeon D., Kim H., Park K., Song H. (2017). Surface immobilization of biphasic calcium phosphate nanoparticles on 3D printed poly(caprolactone) scaffolds enhances osteogenesis and bone tissue regeneration. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 55: 101-109.

Tang X., Mao L., Liu J., Zhi Y., Zhang W., Shu M., Hu N., Jiang L., Fang B. (2016). Fabrication, characterization and cellular biocompatibility of porous biphasic calcium phosphate bioceramic scaffolds with different pore sizes. *Ceramics International*, 42: 15311-15318.

REFERENCIAS

1. Abraham G. (2014). Aportes de la ciencia de materiales al campo de la medicina regenerativa. *Boletín de la Academia Nacional de Medicina*, 92, 415-424.
2. Andrew W. (2012). *Polylactic acid: PLA biopolymer technology and applications*. Plastics Design Library, ISBN 1437744605-9781437744606, pp. 352.
3. Ardila L., Estupiñán H., Vásquez C. y Peña D. (2011). Estudio de la biodegradación hidrolítica de recubrimientos de biopolímeros/cerámico mediante EQCM. *Revista de Ingeniería*, 35, 41-46.
4. Arkin V., MeenuL., Manjubala I., y Kumar N. (2015). Solid state synthesis and characterization of calcium phosphate for biomedical application. *International Journal of Chemtech Research*, 8, 264-267.
5. ASTM D4065-95, Standard practice for plastics: dynamic mechanical properties: determination and report of procedures, ASTM International, west conshohocken, PA, 2001, www.astm.org
6. Babilotte J., Guduric V., Le Nihouannen D., Naveau A., Fricain J. y Catros S. (2019). 3D printed polymer–mineral composite biomaterials for bone tissue engineering: Fabrication and characterization. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1, 1-17.
7. Bao C., Chong M., Qin L., Fan Y., Teo E., Sandikin D. y Chan J. (2019). Effects of tricalcium phosphate in polycaprolactone scaffold for mesenchymal stem cell-based bone tissue engineering. *Materials Technology*, 6, 361-367.
8. Baradaran S., Moghaddam E., Basirunch W., Mehralia M., Sookhakianb M., Hamdi M., Nakhae M. y Alias Y. (2014). Mechanical properties and biomedical applications of a nanotube hydroxyapatite-reduced graphene oxide composite. *Carbon*, 69, 32-45.

9. Berg C. (2017). Influence of magnesium in the formation of phosphate spheres a simple method for the fabrication of spherical particles of calcium and magnesium phosphate. (Tesis de doctorado). Uppsala Universities, Suiza.
10. Bittner S., Smith B., Diaz L., Hudgins C., Melchiorri A., Scotte D., Fisher J., y Mikos A. (2019). Fabrication and mechanical characterization of 3D printed vertical uniform and gradient scaffolds for bone and osteochondral tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 90, 37-48.
11. Bleach N., Nazhat S., Tanner K., Kellomäki M. y Törmälä P. (2002). Effect of filler content on mechanical and dynamic mechanical properties of particulate biphasic calcium phosphate—polylactide composites. *Biomaterials*, 23, 1579-1585.
12. Boanini E., Gazzano M. y Bigi A. (2010). Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomaterialia*, 6, 1882-1894.
13. Bohner M., Galea L. y Doebelin N. (2012). Calcium phosphate bone graft substitutes: failures and hopes. *Journal of the European Ceramic Society*, 32, 2663–2671.
14. Candeiro G., Duarte M., Siqueira D. y Gavini G. (2012). Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions, and flow of a bioceramic root canal sealer. *Basic Research Technology*, 6, 842-845.
15. Carrasco F., Pagés P., Gámez J., Santana O. y MasPOCH M. (2010). Processing of poly(lactic acid): characterization of chemical structure, thermal stability and mechanical properties. *Polymer Degradation and Stability*, 95, 116-125.
16. Castilho M., Moseke C., Ewald A., Gbureck U., Groll J., Pires J., Teßmar J. y Vorndra E. (2014). Direct 3D powder printing of biphasic calcium phosphate scaffolds for substitution of complex bone defects. *Biofabrication*, 6, 1-10.
17. Chen Q., Liang S. y Thouas G. (2013). Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 38, 584–671.

18. Chia H. y Wu B. (2015). Recent advances in 3D printing of biomaterials. *Journal of Biological Engineering*, 9, 1-14.
19. Cox S., Thornby J., Gibbons G., Williams M. y Mallick K. (2015). 3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering*, 47, 237-247.
20. De la Peña F. y Miranda A. (2016). Alternativas de reconstrucción de los defectos óseos mandibulares. *Colegio Mexicano de Cirugía Bucal y Maxilofaxial*, 12, 99-106.
21. Dorozhkin S. (2016). Multiphasic calcium orthophosphate (CaPO₄) bioceramics and their biomedical applications. *Ceramics International*, 6, 6529-6554.
22. Du K., Shi X. y Gan Z. (2013). Rapid biomimetic mineralization of hydroxyapatite-g-PDLLA hybrid microspheres. *Langmuir*, 29, 15293-15301.
23. Ducheyne P., Healy K., Hutmacher D., Grainger D. y Kirkpatrick C. (2015). *Comprehensive Biomaterials*. Newnes, 1, ISBN 978-0-08-055294-1, pp. 672.
24. Ebrahimi M., Botelho M. y Dorozhkin S. (2017). Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Materials Science and Engineering*, 71, 1293-1312.
25. Eliaz N. y Metoki N. (2017). Calcium Phosphate Bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. *Materials*, 10, 1-104.
26. Elliott J. (1994). *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*. Elsevier: Amsterdam, ISBN 148329031X 9781483290317, pp. 1050.
27. Esposito C., Gervaso F., Scalera F., Montagna F., Sannino A. y Maffezzoli A. (2016). The feasibility of printing polylactic acid–nanohydroxyapatite composites using a low-cost fused deposition modeling 3D printer. *Journal of Applied Polymer Science*, 134, 1-10.

28. Fang J., Li P., Lu X., Fang L., Lü X. y Ren F. (2019). A strong, tough, and osteoconductive hydroxyapatite mineralized polyacrylamide/dextran hydrogel for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, 88, 503-513.
29. Ferri J., Gisbert I., García D., Reig M. y Balart R. (2016). The effect of beta-tricalcium phosphate on mechanical and thermal performances of poly(lactic acid). *Journal of Composite Materials*, 50, 4189–4198.
30. Florencio R., Rodrigues G., Sasso E., Simões M. y Cerri P. (2015). Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Research International*, 41, 1-17.
31. Gong T., Xie J., Liao J., Zhang T., Lin S. y Lin Y. (2015). Nanomaterials and bone regeneration. *Bone Research*, 3, 1-17.
32. Ho K., Salamanca E., Chang K., Shih T., Chang Y., Huang H., Teng N., Lin C., Feng S. y Chang W. (2016). Novel HA/ β -TCP-collagen composite enhanced new bone formation for dental extraction socket preservation in beagle dogs. *Materials*, 9, 1-15.
33. Hong M., Kim S. y Lee K. (2017). Mechanical and biological properties of biphasic calcium phosphate scaffold depending on different nanoparticle fabrication methods. *Journal of Ceramic Science Technology*, 4, 541-546.
34. Jayachandran V. y Se K. (2014). Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering—a review. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10, 3124-3140.
35. Jing N., Jiang X., Wang Q., Tang Y. y Zhang P. (2014). Attenuated total reflectance/Fourier transform infrared (ATR/FTIR) mapping coupled with principal component analysis for the study of in vitro degradation of porous polylactide/hydroxyapatite composite material. *Analytical Methods*, 6, 5590–5595.
36. Juárez D., Salas S., Chávez M. y García T. (2017). Síntesis de nano-hidroxiapatita por los métodos sol-gel y coprecipitación. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*, 3, 406-412.

37. Juárez, D. (2018). Andamios por impresión 3D, con base en nano-hidroxiapatita y ácido poliláctico, en la regeneración ósea: síntesis y propiedades mecánicas. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
38. Kaavessina M., Chafidz A., Ali I. y Al-Zahrani S. (2015). Characterization on poly(lactic acid)/hydroxyapatite prepared by a solvent blending technique: viscoelasticity and in vitro hydrolytic degradation. *Journal of Elastomers and Plastics*, 47, 753–768.
39. Kim H., Lee H. y Knowles J. (2016). Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration. *Journal of Biomaterials*, 79A, 643-649.
40. Kokubo, T. y Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. *Biomaterials*, 27, 2907-2915.
41. Lee D., Pai Y., Chang S. y Kim D. (2016). Microstructure, physical properties, and bone regeneration effect of the nano-sized β -tricalcium phosphate granules. *Materials Science and Engineering*, 58, 971-976.
42. Lee J., Lee Y., Rim N., Jo S., Lim Y. y Shin H. (2011). Development and characterization of nanofibrous poly(lactic-co-glycolic acid)/biphasic calcium phosphate composite scaffolds for enhanced osteogenic differentiation. *Macromolecular Research*, 19, 172-179.
43. Lee T., Abdul R. y Rahman W. (2013). *Poly(lactic acid). PLA biopolymer technology and applications*. Elsevier. Great Britain, ISBN 1437744605, 9781437744606, pp. 33-34, 177, 221, 301-304.
44. Li H., Xue F., Wan X., Liu H., Bai J. y Chu C. (2016). Polyethyleneglycol-assisted preparation of beta-tricalcium phosphate by direct precipitation method. *Powder Technology*, 301, 255-260.
45. Li Q., y Mai E. (2017). *Biomaterials for implants and scaffolds*. Springer: Australia. ISBN 978-3-662-53572-1, pp. 273-282.
46. Lin H., Kyoung H., Jin K., Ahn H., Lee H. y Tae K. (2015). Phase transformation from hydroxyapatite to the secondary bone mineral, whitlockite. *Journal of Materials Chemistry*, 3, 1342-1349.

47. Ling S. y Abdul Z. (2019). Characterization of chicken bone waste-derived hydroxyapatite and its functionality on chitosan membrane for guided bone regeneration. *Composites Part B: Engineering*, 163, 562-573.
48. Liu H., Yazici H., Ergun C., Webster T. y Bermek H. (2008). An in vitro evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 4, 1472-1479.
49. Logesh M., Marimuthu A. y Ballamurugan A. (2019). Fabrication of graphene incorporated biphasic calcium phosphate composite and evaluation of impact of graphene in the in-vitro biomineralization process. *Materials Chemistry and Physics*, 232, 75-81.
50. Lu Y., Wang C., Yu J. y Lu S. (2018). Study on preparation and structural properties of high toughness polylactic acid. *Materials Science and Engineering*, 394, 1-5.
51. Luo J., Chen J., Wenzhao L., Zhiliang H. y Chen C. (2015). Temperature effect on hydroxyapatite preparation by co-precipitation method under carbamide influence. *EDP Sciences*, 26, 1004-1007.
52. Marchi J., Ribeiro C., Almeida A. y Martins M. (2013). Cell response of calcium phosphate based ceramics, a bone substitute material. *Materials Research*, 16, 703-712.
53. Martin A. y Martin L. (2019). Matrices para Ingeniería del tejido óseo. *Actualidad Médica*, 104, 36-45.
54. Martínez A. y Esparza H. (2008). Caracterización estructural y morfológica de hidroxiapatita nanoestructurada: estudio comparativo de diferentes métodos de síntesis. *Superficies y Vacío*, 21, 18-21.
55. Massit A., Yacoubi A., Idrissi C. y Yamni K. (2014). Synthesis and characterization of nano-sized β -tricalcium phosphate: effects of the aging time. *Journal of Applied Chemistry*, 7, 54-61.
56. Matsunaga K., Kubota T., Toyoura K. y Nakamura A. (2015). First-principles calculations of divalent substitution of Ca^{2+} in tricalcium phosphates. *Acta Biomaterialia*, 23, 329-337.

57. Miao X., Meifang D., Li J., Xiao Y. y Crawford R. (2008). Mechanical and biological properties of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds coated with poly(lactic-co-glycolic acid). *Acta Biomaterialia*, 4, 638-645.
58. Minte C., Alikhani M., Teixeira C., y Sandoval P. (2019). Teoría bifásica del movimiento dentario aplicada mediante micro-osteo-perforaciones. *International Journal of Odontostomatology*, 13, 180–183.
59. Moataz E., Kim K., Park J. y Deep A. (2017). Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 1346-1352.
60. Monmaturapoj N., Srion A., Chalermkarnon P., Buchatip S., Petchsuk A., Noppakunmongkolchai W. y Mai K. (2017). Properties of poly(lactic acid)/hydroxyapatite composite through the use of epoxy functional compatibilizers for biomedical application. *Journal of Biomaterials Applications*, 32, 175–190.
61. Montañez N., Estupiñan H., García S., y Peña D. (2018). Fabrication and characterization of novel biphasic calcium phosphate and nanosized hydroxyapatite derived from fish otoliths in different composition ratios. *Chemical Engineering Transactions*, 64, 307-312.
62. Narayanan G., Vernekar V., Kuyinua E. y Laurencin C. (2016). Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 247–276.
63. Ochoa D., Nieto R. y Aguilera A. (2015). Ingeniería de tejidos. Una nueva disciplina en medicina regenerativa. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 64, 61-69.
64. Owen R., Dard M. y Larjava H. (2018). Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. *Journal of Medical Materials*, 106, 2493-2512.
65. Pesenti H., Ríos R., Leoni M., Motta A. y Scardi P. (2014). Re-engineering of natural apatite for scaffold of hard tissues. *Materials*, 19, 247-256.

66. Pina S., Oliveira J. y Reis R. (2015). Natural-Based Nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: a review. *Advanced Materials*, 27, 1143-1169.
67. Plazas C. y Ardila I. (2016). Caracterización de hidroxiapatita por difracción de rayos X obtenida a partir de carbonato de calcio y fosfato de potasio monobásico, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá.
68. Poologasundarampillai G. y Nommeets A. (2017). Materials for 3D printing in medicine: metals, polymers, ceramics, hydrogels. *3D Printing in medicine*, 1, 43-71.
69. Pretto M., Costa A., Landi E., Tampieri A. y Galassi C. (2003). Dispersing behavior of hydroxyapatite powders produced by wet-chemical synthesis. *Journal of the American Ceramic Society*, 86, 1534-1539.
70. Prezas P., Melo B., Costa L., Valente M., Lança M., Ventura J., Pinto L., Graça M. (2017). TSDC and impedance spectroscopy measurements on hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate and hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate biphasic bioceramics. *Applied Surface Science*, 424, 28-38.
71. Qiu Q., Ducheyne P. y Ayyaswamy D. (2000). New bioactive, degradable composite microspheres as tissue engineering substrates. *Journal of Biomedical Materials Research Banner*, 52, 66-76.
72. Reyes B., Juárez D. y Chávez M. (2018). Estudio de las condiciones para la síntesis de la hidroxiapatita y el β -fosfato tricálcico. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*, 4, 365-370.
73. Reyes J., Martínez E., Rodríguez G., Tiznado G., García R. y Brès E. (2013). XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering*, 33, 4568–4574.
74. Reza H., Saboktakin M., Aghababaei E., y Ebrahimian M. (2017). Thermal stability of nano-hydroxyapatite synthesized via mechanochemical treatment. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 42, 4401–4408.

75. Rho J., Ashman R. y Turner C. (1993). Young's modulus of trabecular and cortical bone material: ultrasonic and microtensile measurements. *Journal of Biomechanics*, 26, 111-119.
76. Riancho J. y Delgado J. (2011). Mecanismos de interacción osteoblasto-osteoclasto. *Reumatología Clínica*, 7, 1-4.
77. Rivera J., Fetter G. y Bosch P. (2011). Efecto del pH en la síntesis de hidroxiapatita en presencia de microondas. *Matéria*, 15, 506-515.
78. Roldán S., Vargas C., Mejía M., Zapata J. y Moncada M. (2016). *Ingeniería de tejidos y aplicaciones*. Instituto Tecnológico Metropolitano. ISBN 9588743842-9789588743844, pp. 277-290.
79. Roohani S., Newman P. y Zreiqat H. (2016). Design and fabrication of 3d printed scaffolds with a mechanical strength comparable to cortical bone to repair large bone defects. *Scientific Reports*, 6, 1-8.
80. Russias J., Saiz E., Deville S., Gryn K., Liu G., Nalla R. y Tomsia A. (2007). Fabrication and in vitro characterization of three-dimensional organic/inorganic scaffolds by robocasting. *Journal of Biomedical Materials Research*, 83A, 434-445.
81. Russias J., Saiz E., Nalla R. y Tomsia P. (2006). Microspheres as building blocks for hydroxyapatite/polylactide biodegradable composites. *Journal of Materials Science*, 41, 5127-5133.
82. Sadat M., Khorasani M., Dinpanah E. y Jamshid A. (2013). Synthesis methods for nano sized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, 9, 7591–7621.
83. Sanyang M., Sapuan S.,Jawaid M., Ishak M. y Sahari J. (2016). Development and characterization of sugar palm starch and poly(lacticacid) bilayer films. *Carbohydrate Polymers*, 146, 36–45.
84. Segura S., Juárez D. y Chávez M. (2018). Pruebas in vitro de andamios 3D de biomaterial compuesto, formado por hiroxiapatita y ácido poliláctico. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*, 4, 359-364.

85. Shim K., Kim S., Yun Y., Jeon D., Kim H., Park K. y Song H. (2017). Surface immobilization of biphasic calcium phosphate nanoparticles on 3D printed poly(caprolactone) scaffolds enhances osteogenesis and bone tissue regeneration. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 55, 101–109.
86. Shuai C., Li P., Liu J. y Peng S. (2013). Optimization of TCP/HAP ratio for better properties of calcium phosphate scaffold via selective laser sintering. *Materials Characterization*, 77, 23-31.
87. Silva S., Lima S., Guilhen S., Courrol L. y Bressiani. (2016). Evaluation of europium-doped HA/ β -TCP ratio fluorescence in biphasic calcium phosphate nanocomposites controlled by the pH value during the synthesis. *Journal of Luminescence*, 180, 177-182.
88. Sobczak A., Pluta K., Malina D. y Tyliszczak B. (2017). Studies on Bone-Derived Calcium Phosphate Materials. *Journal of Renewable Materials*, 5, 180-188.
89. Tan L., Yu X., Wan P. y Yang K. (2013). Biodegradable materials for bone repairs: A review. *Journal of Mechanical Science and Technology*, 6, 503-513.
90. Tang X., Mao L., Liu J., Zhi Y., Zhang W., Shu M., Hu N., Jiang L. y Fang B. (2016). Fabrication, characterization and cellular biocompatibility of porous biphasic calcium phosphate bioceramic scaffolds with different pore sizes. *Ceramics International*, 42, 15311-15318.
91. Tarafder S., Balla V., Davies N., Bandyopadhyay A. y Bose S. (2013). Microwave-sintered 3D printed tricalcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7, 631-641.
92. Timofejeva A., D'Este M. y Loca D. (2017). Calcium phosphate/polyvinyl alcohol composite hydrogels: a review on the freeze-thawing synthesis approach and applications in regenerative medicine. *European Polymer Journal*, 95, 547-565.

93. Torres A., Gaspar V., Serra I., Diogo G., Fradique R., Silva A. y Correia I. (2013). Bioactive polymeric–ceramic hybrid 3D scaffold for application in bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering*, 33, 4460–4469.
94. Trindade R., Albrektsson T., Tengvall P., y Wennerberg A. (2016). Foreign body reaction to biomaterials: on mechanisms for buildup and breakdown of osseointegration. *Foreign Body Reaction to Biomaterials*, 18, 192-206.
95. Tuj F. y Mohammad A. (2014). Biomaterials as porous scaffolds for tissue engineering applications: a review. *European Scientific Journal*, 10, 186-209.
96. Watering F., Beucken J., Walboomers X. y Jansen J. (2012). Calcium phosphate/poly(D,L-lactic-coglycolicacid) composite bone substitute materials: evaluation of temporal degradation and bone ingrowth in a rat critical-sized cranial defect. *Clinical Oral Implants Research*, 23, 151–159.
97. Xidaki D., Agrafioti P., Diomatari D., Kaminari A., Tsalavoutas E., Alexiou P., Psycharis V., Tsilibary E., Silvestros S. y Sagnou M. (2018). Synthesis of hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate particles to act as local delivery carriers of curcumin: loading, release and in vitro studies. *Materials*, 11, 1-13.
98. Xu S., Liu J., Zhang L., Yang F., Tang P. y Wu D. (2017). Effects of HAP and TCP in constructing tissue engineering scaffolds for bone repair. *Journal of Materials Chemistry*, 5, 601-610.
99. Yashima M., Sakai A., Kamiyama T. y Hoshikawa A. (2003). Crystal structure analysis of β -tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ by neutron powder diffraction. *Journal of Solid State Chemistry*, 175, 272–277.
100. Yi L. y Liu J. (2017). Liquid metal biomaterials: a newly emerging area to tackle modern biomedical challenges. *International Materials Reviews*, 62, 415-440.
101. Zadpoor A. (2014). Review: relationship between in vitro apatite-forming ability measured using simulated body fluid and in vivo bioactivity of biomaterials. *Materials Science and Engineering*, 35, 134–143.