



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA
MATERIALES CERÁMICOS

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROXIAPATITA NANOMÉTRICA
MEDIANTE EL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN QUÍMICA USANDO CÁSCARA
DE HUEVO COMO PRECURSOR DE CALCIO”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:
ING. OMAR MAURICIO GOMEZ VAZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL:
DR. MARIO ENRIQUE RODRÍGUEZ GARCÍA
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. BEATRIZ MARCELA MILLÁN MALO
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA
DR. JULIO GREGORIO MENDOZA ALVAREZ
CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS

QUERÉTARO, QRO.

ENERO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	6
INDICE DE FIGURAS	7
INDICE DE TABLAS	9
1.1 INTRODUCCIÓN	10
1.2 JUSTIFICACIÓN	13
1.3 HIPÓTESIS	14
1.4 OBJETIVOS	15
1.4.1 Objetivo General	15
1.4.2 Objetivos Específicos	15
MARCO TEÓRICO	16
2.1 HUESO	16
2.2 HIDROXIAPATITA	17
2.3 MÉTODOS DE OBTENCIÓN	19
2.3.1 Obtención a Partir de Fuentes Naturales	19
2.3.2 Obtención a Partir de Rutas Químicas	21
2.3.3 Obtención a Partir de Procesos Combinados	25
2.4 TECNICAS DE CARACTERIZACIÓN	28
2.4.1 Análisis Térmico (TGA/DSC)	28
2.4.2 Difracción de Rayos X (DRX)	31
2.4.3 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	35
2.4.4 Microscopia Electrónica de Barrido de Alta Resolución (HR-SEM)	37
2.4.5 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)	39
2.4.6 Espectroscopía de Emisión Óptica con Plasma de Acoplamiento por Inducción (ICP-OES)	41
MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1 METODOLOGÍA	43
3.1.1 Obtención De Hidróxido De Calcio A Partir De Cáscara De Huevo	43
3.1.2 Síntesis de Hidroxiapatita Usando Hidróxido de Calcio como Precursor	44

3.2 ANÁLISIS TÉRMICO POR TGA/DSC	45
3.3 CARACTERIZACIÓN POR RAYOS X	45
3.4 CARACTERIZACIÓN POR FTIR.....	46
3.5 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA HR-SEM	46
3.6 CONTENIDO MINERAL POR ICP-OES	47
3.7 TAMAÑO DE PARTÍCULA POR DLS	48
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	49
4.1 ANÁLISIS TÉRMICO DE LA CÁSCARA DE HUEVO POR TGA/DSC.....	49
4.2 ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL CICLO DE LA CAL DE CÁSCARA DE HUEVO Y DE LAS HAPS (HR-SEM)	51
4.3 ANÁLISIS CRISTALOGRÁFICO DEL CICLO DE LA CAL Y HAPS (DRX).....	54
4.4 ESTUDIO DE LOS ESTADOS VIBRACIONALES DEL CICLO DE LA CAL Y HAPS POR FTIR.....	57
4.5 ANÁLISIS DE CONTENIDO MINERAL A PARTIR DE ICP-OES.....	61
4.6 ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE PARTÍCULA POR DLS.....	63
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA.....	64
REFERENCIAS	65
ANEXOS	72
PUBLICACIONES	78

DEDICATORIA

La presente Tesis se la dedico a mi familia que son mi apoyo incondicional y confían ciegamente en todo lo que hago y lo que me propongo.

A mi compañera de vida Jazmín y a mi motor para seguir adelante mi hija Paula por su amor y por todo el apoyo que me han brindado sin pedir nada a cambio.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario Enrique Rodríguez García, quien nos brindó un lugar en su laboratorio de biocerámicos para poder realizar los estudios de posgrado, así como darnos el privilegio de que sea nuestro asesor principal en esta etapa de crecimiento académico.

A la Dra. Sandra Milena Londoño Restrepo por la paciencia que nos ha tenido y el apoyo brindado para poder seguir siendo mejores a cada momento.

A la Dra. Beatriz Marcela Millán Malo y al Dr. Julio Gregorio Mendoza Álvarez que por ser parte de mi comité tutor sus comentarios en cada sesión fueron de gran ayuda para poder mejorar constantemente.

A todos los compañeros y amigos del equipo de trabajo del Dr. Mario Enrique Rodríguez.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el soporte financiero en la realización de mis estudios de maestría.

Al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada y a la máxima casa de estudios de México la Universidad Nacional Autónoma de México por ser parte de mi hogar durante estos dos años donde se realizaron mis estudios de maestría.

Al programa UNAM-PAPIIT IN114320 y al programa SEP-CONACYT ciencia básica A1-S1-8979 que gracias a los recursos por parte de estos proyectos se pudo financiar la investigación realizada para la elaboración de esta tesis.

Al Programa PAEP por su apoyo en la compra de materiales y reactivos y en la participación en congreso internacional.

Al Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales (LaMCAm) del Centro de Física Aplicada y Tecnología avanzada por su soporte técnico en la caracterización de las muestras obtenidas a lo largo de esta investigación.

Al Dr. Manuel Aguilar Franco por su ayuda en la caracterización de microscopía electrónica de barrido.

Nuevamente a la Dra. Beatriz Marcela Millán Malo por su apoyo y soporte técnico en el laboratorio de difracción de rayos X.

RESUMEN

Hoy en día el enfoque de los nanomateriales ha ido en aumento debido a que presentan propiedades nuevas en comparación a los materiales de tamaños superiores, en este sentido también ha tomado un gran interés los biomateriales los cuales pueden ser utilizados en sistemas biológicos con una aplicación definida. Para este caso los biomateriales deben tener importantes características en la que destaca la biocompatibilidad y características más específicas ya con un enfoque particular.

En la ingeniería de tejidos se han estudiado biomateriales que puedan tener principalmente esta propiedad de biocompatibilidad, pero, esto no puede ser suficiente a la hora de aplicar el biomaterial ya que aun así se puede presentar rechazo en el sistema biológico, por esta razón la importancia de obtener un biomaterial para la regeneración ósea guiada (BGR) que aparte de tener propiedades de biocompatibilidad también posea biodegradabilidad, osteointegración y osteoconductividad, para que ayuden al a mejorar la integración del biomaterial con el sistema biológico.

En este trabajo se obtuvo hidroxiapatita nanométrica con diferentes iones como los que están presentes de forma natural en los huesos de mamíferos. Se sintetizó mediante precipitación química utilizando $\text{Ca}(\text{OH})_2$ obtenido de cáscaras de huevo como precursor. La posterior calcinación se realizó a una temperatura baja de $250\text{ }^\circ\text{C}$ para eliminar los subproductos de la reacción para evitar la transición de tamaño de cristal a tamaños micrométricos. Los cristales sintéticos de hidroxiapatita exhibieron morfologías esféricas irregulares con un diámetro de Feret que variaba de 10 a 45 nm. Más importante aún, esta hidroxiapatita contiene niveles de Ca^{+2} , Mg^{+2} , P^{+5} , Na^{+1} , Sr^{+2} , K^{+1} , Si^{+2} , Fe^{+3} , Al^{+3} y Ba^{+2} , cercanos a los reportados para huesos de mamíferos. El análisis de la hidroxiapatita sintética comercial reveló que sus cristales forman grupos de escamas micrométricas que no tienen iones adicionales, sino solo Ca y P.

Palabras clave

Biomateriales; Cáscaras de huevo; Minerales; Ruta de síntesis; Morfología; Propiedades estructurales.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Estructura del tejido óseo [19].....	16
Figura 2.- Estructura cristalina de la hidroxiapatita [20].....	17
Figura 3.- Composición mineral de BioHAp [2].....	18
Figura 4.- Micrografías SEM de BioHAp obtenida por procesos de calcinación 700 a 1100 °C [24]	20
Figura 5.- Diferentes rutas en las que se puede obtener HAp a partir de fuentes naturales [19]	27
Figura 6.- a) Principio de la técnica TGA/DSC, b) Equipo que se utiliza para realizar TGA/DSC simultáneamente y c) Ejemplo de graficas TGA/DSC [38]	30
Figura 7.- Espectro Electromagnético	31
Figura 8.- Radiación continua y radiación característica de los rayos X [39].....	32
Figura 9.- Esquema de la transición de nivel de un electrón [39]	32
Figura 10.- Ley de Bragg en plano (100) [39].....	33
Figura 11.- Principio de la técnica de Difracción de Rayos X [39]	34
Figura 12.- Patrón de difracción de rayos X a) material cristalino, b) material amorfo [40]	35
Figura 13.- Principio de la técnica FTIR [43]	37
Figura 14.- Esquema de las partes del Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) [46]...	38
Figura 15.- Esquema de la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) [49]	41
Figura 16.- Esquema de la técnica de ICP-OES [50]	42
Figura 17.- Diagrama de proceso de obtención de Ca(OH) ₂	43
Figura 18.- Diagrama de bloques del proceso de síntesis de hidroxiapatita	44
Figura 19.- Fotografía del equipo de Difracción de Rayos X	45
Figura 20.- Fotografía del equipo de FTIR	46
Figura 21.- Fotografía del equipo de HR-SEM.....	47

Figura 22.- Fotografías de a) Microondas CEM y b) Equipo de ICP-OES.....	47
Figura 23.- Fotografía del equipo de DLS	48
Figura 24.- Termograma de Cáscara de huevo, a) TGA y b) DSC	50
Figura 25.- Ciclo de la Cal a partir de cáscara de huevo.....	51
Figura 26.- Micrografías de HR-SEM a), c) y e) corresponden HAp-E, b), d) y f) HAp-C y g) Diámetro de Feret para HAp-E y HAp-C	53
Figura 27.- Patrones de Difracción, a) $\text{CaCO}_3\text{-E}$ y $\text{CaCO}_3\text{-C}$, b) CaO-E y CaO-C , c) $\text{Ca(OH)}_2\text{-E}$ y $\text{Ca(OH)}_2\text{-C}$, d) FWHM del ciclo de cáscara y comercial, e) Tamaño de cristal utilizando la ecuación de Scherrer.....	55
Figura 28.- a) Patrón de difracción de HAp-E y HAp-C y b) FWHM y Tamaño de cristal por Scherrer de HAp-E y HAp-C	57
Figura 29.- Espectro FTIR de a) $\text{CaCO}_3\text{-E}$ y $\text{CaCO}_3\text{-C}$, b) CaO-E y CaO-C y c) $\text{Ca(OH)}_2\text{-E}$ y $\text{Ca(OH)}_2\text{-C}$	58
Figura 30.- Espectro FTIR de HAp-E y HAp-C.....	60
Figura 31.- Distribución de tamaño de partícula por DLS.....	63

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Posiciones de las bandas FTIR de las muestras de cáscara de huevo y muestras comerciales de CaCO_3 , CaO y Ca(OH)_2	59
Tabla 2.- Posición de las bandas de FTIR de HAps	60
Tabla 3.- Contenido mineral de cáscaras de huevo (Raw-E), HAps de huesos humanos (HAps-H), HAps de huesos bovinos (HAps-B), HAps de huesos porcinos (HAps-P), HAps sintetizada a partir de cáscaras de huevo (HAps-E) y Sigma Aldrich HAps (HAps-C).....	62

CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la demanda de biomateriales para aplicaciones clínicas es cada vez más importante. Uno de los materiales con un amplio interés en los últimos años es la hidroxiapatita (HAp) que es un fosfato de calcio con fórmula química $(Ca_5(PO_4)_3OH)$ y una relación estequiométrica Ca/P de 1.67. Se han utilizado comúnmente dos rutas para obtener HAp. La primera usa huesos de mamíferos y la segunda ruta es a partir de procesos químicos con diferentes precursores. Como es bien sabido, la HAp de huesos de mamíferos está formada por Ca^{+2} , P^{+5} y otros iones minoritarios como Mg^{+2} , Na^{+1} , K^{+1} , Fe^{+3} , Si^{+2} , entre otros, que juegan papeles esenciales en la osteointegración [1]. Sin embargo, las rutas químicas implican diferentes enfoques para incluir estos iones, como se mencionó anteriormente. En ambos casos, la incineración es necesaria para obtener HAp pura. La calcinación ósea requiere el control de la velocidad de calentamiento [2], [3], la temperatura de sinterización [4], la velocidad de enfriamiento [5] y la atmósfera [6], [7]. Por otro lado, la incineración es fundamental para eliminar los precursores o fases secundarias formadas durante las reacciones. Por lo mencionado previamente la calcinación se realiza a baja temperatura debido a que no afecta a las propiedades fisicoquímicas de la HAp.

Uno de los principales problemas asociados con la incineración es la temperatura de sinterización. Se ha informado que los HAp de huesos humanos, bovinos y porcinos están compuestos de cristales nanométricos y altamente ordenados [2], y que la coalescencia de nanocristales produce una transición de tamaño de nano a micro alrededor de 720 °C como lo demuestran Londoño-Restrepo et al., [8]. Esta temperatura limita cualquier proceso térmico utilizado para sinterizar hidroxiapatitas nanométricas con propósitos clínicos. Sin embargo, las temperaturas de calcinación todavía se registran entre 100 y 1200 °C [9-12].

La obtención de HAp también se ha hecho utilizando precursores naturales como lo son cascara de huevo, estrellas de mar, y conchas de mar [13] haciendo uso del alto contenido de calcio presente en ellos, en este sentido la cascara de huevo que es desecho presente en la mayoría de los lugares por el uso del huevo como alimento, a partir de esto estudios de la estructura y la composición de la cascara de huevo se ha reportado que se compone de

aproximadamente un 2 % de una matriz orgánica un 96 % de carbonato de calcio (CaCO_3) que es el polimorfo más estable del calcio a temperatura ambiente y presión atmosférica y el resto de la composición es de iones minoritarios como Mg^{+2} , Na^{+1} , Zn^{+2} , Sn^{+2} , Fe^{+3} , Si^{+2} , entre otros [14], [15].

Se ha reportado de la síntesis de HAp utilizando cáscara de huevo como precursor. Rivera et al., [10] utilizó un método hidrotermal para sintetizar HAp. El CaO de las cáscaras de huevo se añadió a una solución de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en un recipiente herméticamente cerrado para conservar la humedad. Posteriormente, el recipiente se calentó hasta $1050\text{ }^\circ\text{C}$ durante 3h a una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. Sin embargo, los resultados de los rayos X mostraron que HAp no es la única fase presente. Parte del CaO no reacciona en el proceso. Gergely et al., [16] utilizó un enfoque mecánico para sintetizar el HAp. Las cáscaras de huevo se calcinaron a $900\text{ }^\circ\text{C}$ durante 3h, moliendo el CaO en un molino de bolas con bolas de alúmina y circonio. Una reacción exotérmica con ácido fosfórico reaccionó con los polvos triturados. Las mezclas se molieron durante 5 h a 4000 rpm (molienda con atritor) y durante 10 h a 350 rpm (molienda de bolas) obteniendo una mezcla homogénea y para evitar la agregación. Sin embargo, los resultados de los rayos X mostraron que se sintetizaron otros fosfatos de calcio durante la reacción. Sin embargo, no se ha reportado el contenido mineral de las HAp sintetizadas a partir de la cáscara de huevo que es uno de los principales enfoques que se puede dar a la obtención de HAp a partir de la cáscara de huevo.

Abidi et al., [11] utilizando el método de precipitación química húmeda, sintetizó hidroxiapatita a partir de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y H_3PO_4 como precursores, y NH_4OH para controlar el pH de la reacción. Al final de la reacción, se calcinaron a $1200\text{ }^\circ\text{C}$. Sin embargo, según [2], esta temperatura no es la adecuada para obtener nanocristales de hidroxiapatita. Rodríguez-Lugo et al., [17] y Abdul-Rauf et al., [18] han sintetizado HAp utilizando el método de precipitación química, variando parámetros como la temperatura de sinterización y el pH de la reacción. Descubrieron que el control del pH de la reacción es vital; para pH 9, 10 y 11 de muestras incineradas a $900\text{ }^\circ\text{C}$, estaban presentes otras fases y los microcristales formaron la HAp.

Shojai et al., [19] presentó una revisión de los métodos de síntesis de HAp nanométrica. Demostraron que el pH y la concentración de los precursores son los principales parámetros

que influyen en la morfología de HAp. Por tanto, es fundamental controlar el pH y las concentraciones en la reacción y, al final, controlar la temperatura de sinterización para evitar el aumento en el tamaño de cristal.

El objetivo de este trabajo fue obtener nano-HAp por el método de precipitación química utilizando Ca(OH)_2 obtenido de cáscaras de huevo como precursor, y aprovechar los iones que contiene naturalmente la cáscara de huevo para mantenerlos en la hidroxiapatita y que estén en cantidades similares a las cantidades de iones que contiene la hidroxiapatita del hueso humano. La primera parte está relacionada con la metodología utilizada para obtener hidróxido de calcio (Ca(OH)_2) de las cáscaras de los huevos de gallina a través del ciclo de la cal. Y la segunda parte es la obtención y la caracterización de HAp. Se calcinó HAp a bajas temperaturas para eliminar los subproductos de la reacción. El ciclo de la cal de las cáscaras de huevo ($\text{CaCO}_3\text{-CaO-Ca(OH)}_2$), hidroxiapatita de cáscara de huevo (HAp-E) e hidroxiapatita comercial (HAp-C) se caracterizaron utilizando plasma acoplado inductivamente, análisis termogravimétrico, calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido y espectroscopia infrarroja.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Por el gran incremento del enfoque en nanomateriales con propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, osteointegración y buenas propiedades mecánicas usados como sustituto óseo y que ayuden a la regeneración ósea guiada (BGR), los procesos de obtención se han vuelto cada vez más demandantes, por ejemplo en hidroxiapatita se busca que el material obtenido sea lo más parecido tanto en propiedades físico-químicas como en morfología y tamaño, esto para que la aceptación del nuevo material en la parte dañada sea óptima.

Por tal razón se utiliza una ruta de síntesis de hidroxiapatita relativamente simple usando cáscara de huevo como precursor de iones de Ca^{2+} que se compone principalmente de 96 % p/p carbonato de calcio y el resto está compuesto por material orgánico como una membrana proteica, e inorgánico como iones Mg^{+2} , Na^{+1} , Sr^{+2} , K^{+1} , Si^{+2} , Fe^{+3} , Al^{+3} , Zn^{+2} , Ba^{+2} , en cantidades similares a las que contiene el hueso humano. Así se busca obtener una hidroxiapatita de tamaño nanométrico por una ruta química que contenga las cantidades de iones similares a las del hueso humano.

1.3 HIPÓTESIS

Es posible sintetizar hidroxiapatita de tamaño nanométrico por el método de precipitación química que contenga en su estructura química iones minoritarios como los presentes en el hueso del cuerpo humano, aprovechando la composición de la cáscara de huevo y usándola como precursor de calcio y fosfato de amonio como precursor de fosfato.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo General

Sintetizar hidroxiapatita nanométrica que contenga iones en cantidades similares a la hidroxiapatita presente en los huesos de humanos a partir de fosfato de amonio e hidróxido de calcio obtenido de cáscara de huevo como precursores.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Obtener hidróxido de calcio a partir de cáscara de huevo para utilizarlo como precursor de calcio en la síntesis de hidroxiapatita.
- Sintetizar hidroxiapatita nanométrica a partir de fosfato de amonio e hidróxido de calcio obtenido de cáscara de huevo como precursores.
- Estudiar los estados vibracionales correspondientes a la estructura de la hidroxiapatita por espectroscopia infrarroja.
- Estudiar la estructura cristalina a partir de difracción de rayos X para verificar la fase pura de la hidroxiapatita.
- Estudiar el contenido mineral de la hidroxiapatita sintetizada a partir de cáscara de huevo por ICP.
- Estudiar la morfología de la hidroxiapatita a partir de microscopia electrónica de barrido de alta resolución.
- Estudiar la distribución del tamaño de partícula usando la técnica de dispersión de luz dinámica.

MARCO TEÓRICO

2.1 HUESO

El tejido del hueso es considerado uno de los composites más importante debido a su papel tan importante en los seres vivos, éste material está formado de dos fases principales, la fase orgánica que es alrededor de 20% de su peso total en el cual está presente la hélice de colágeno de tipo 1, proteínas, lípidos, células, y material genético, y por otra parte la fase inorgánica que representa el 70% del total del peso del tejido óseo y está compuesta por fosfatos de calcio que en su mayoría el principal es un fosfato de calcio nombrado hidroxiapatita y que en su estructura contiene iones como Mg^{+2} , Na^{+1} , Zn^{+2} , Sr^{+2} , entre otros, los cuales son de gran importancia en las actividades que realiza el cuerpo naturalmente para su regeneración continua, el otro 10% del peso total del tejido óseo está compuesto por agua. Estas fases juegan un papel muy importante en las propiedades físico-químicas del hueso ya que en conjunto le proveen esa fuerza y resiliencia característica [20].

En la figura 1 podemos ver la composición del tejido óseo desde su macroestructura hasta sus composiciones elementales que están en el régimen nanométrico, esta es la importancia de mantener la hidroxiapatita en este régimen.

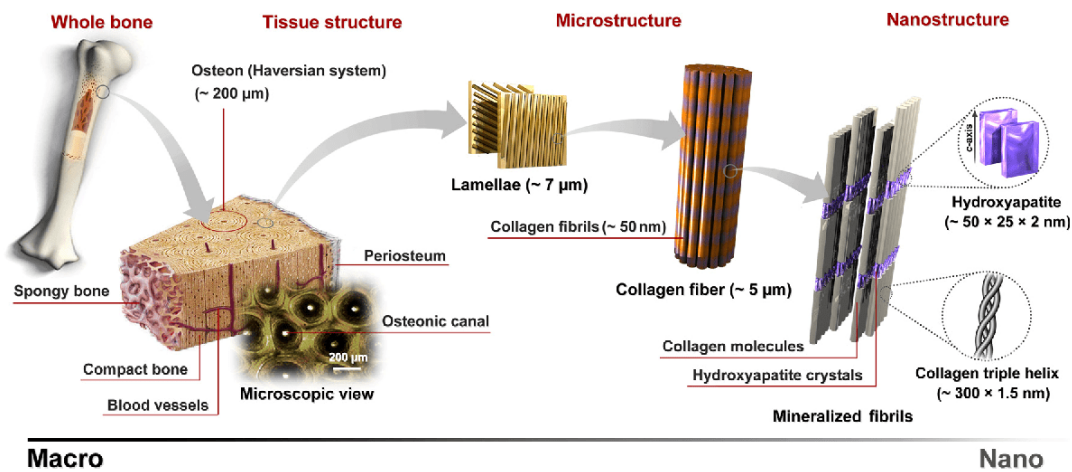


Figura 1.- Estructura del tejido óseo [19]

2.2 HIDROXIAPATITA

La hidroxiapatita (HAp) es una cerámica de fosfato de calcio que pertenece a la familia de las apatitas con una fórmula química $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ y una relación estequiométrica de Ca/P de 1.67 que en comparación con la hidroxiapatita presente en los huesos de mamíferos (BioHAp) que tiene una estequiometría que varía de 1.8 a 3 esto se debe a la ingesta de estos minerales que se hace por medio de la dieta y los iones sustitucionales que contiene la BioHAp de manera natural en su estructura.[21] Este mineral tiene una estructura cristalina hexagonal compacta con un grupo espacial de $P6_3/m$, y con átomos de oxígeno en los espacios tetrahedrales y octahedrales y parámetros de red de $a = b = 9.37 \text{ \AA}$, $c = 6.88 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90$ grados, $\gamma = 120$ grados.[22] Podemos ver la estructura de la hidroxiapatita en la figura 2, así como se distribuyen los átomos dentro de la celda unitaria.

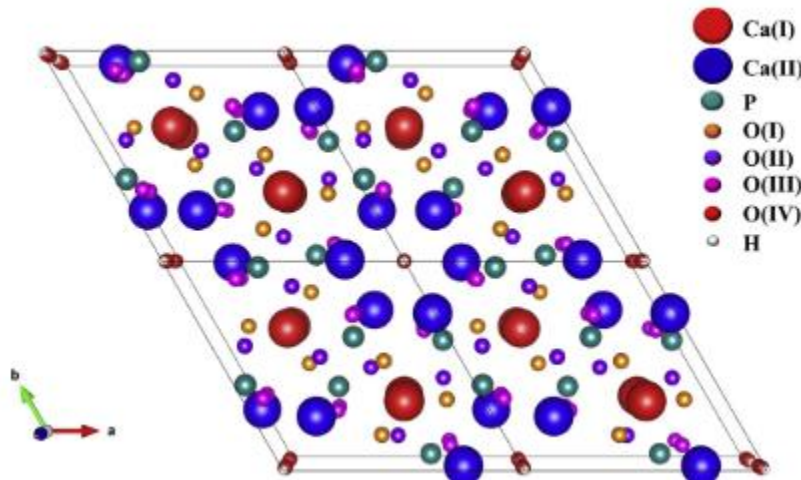


Figura 2.- Estructura cristalina de la hidroxiapatita [20]

Como se mencionó anteriormente la BioHAp que es la que está presente en los huesos de mamíferos tiene trazas de minerales minoritarios que de manera aleatoria ocupan sitios sustitucionales de átomos Ca (II) que aparece en la figura 2 [23], esta cuantificación de iones minoritarios los podemos observar en la figura 3 la cual muestra la comparación de los iones

que están presentes en la BioHAp de hueso humano, bovino y porcino antes y después de un tratamiento térmico a 720 °C y que tienen una gran importancia en los procesos biológicos que realiza el cuerpo de manera natural en procesos de remodelación [2]

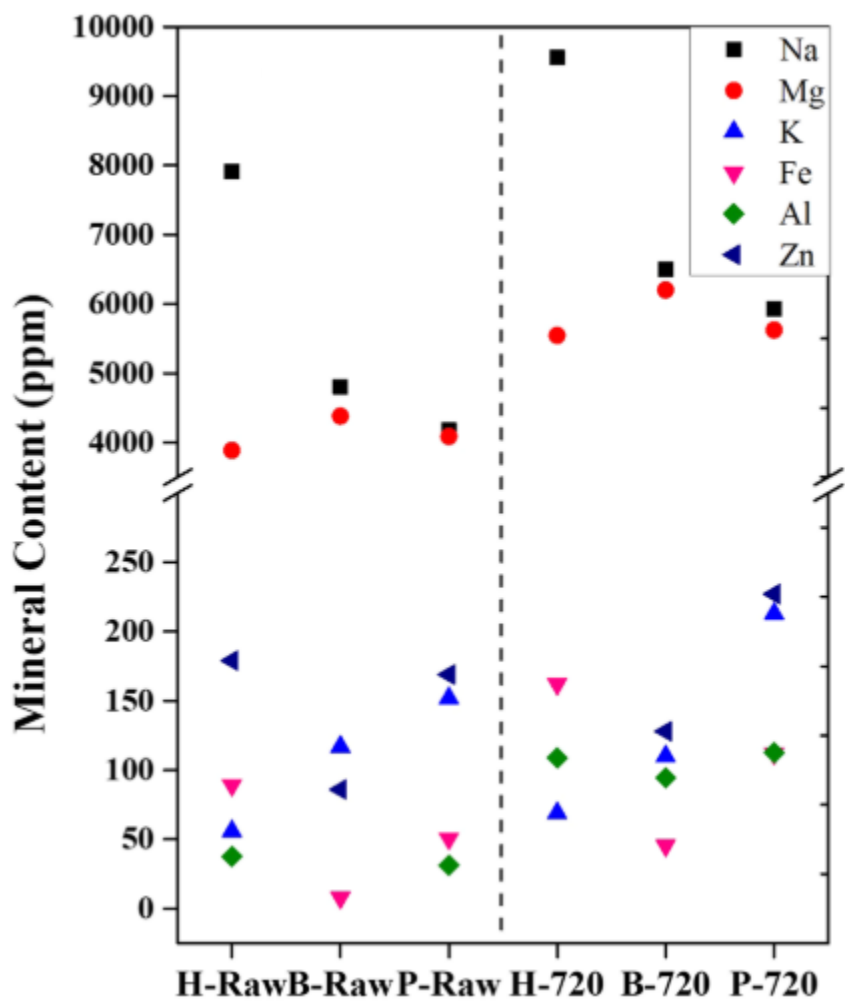


Figura 3.- Composición mineral de BioHAp [2]

2.3 MÉTODOS DE OBTENCIÓN

La hidroxiapatita es un biomaterial que está siendo ampliamente usando en la regeneración ósea guiada (BGR) por sus siglas en inglés, es por esto que se han reportado diferentes métodos para su obtención entre las que se caracterizan principalmente por fuentes naturales y por rutas químicas:

2.3.1 Obtención a Partir de Fuentes Naturales

2.3.1.1 Huesos de Humano, Bovino y Porcino.

Recientemente se han desarrollado técnicas en las cuales se resumen en aislar los cristales de BioHAp a partir de hueso trabecular (parte dura del tejido) usando técnicas de desgrasado, desproteínizado, y eliminación del material genético de los portadores anteriores. Londoño-Restrepo et al., [24] desarrollo un proceso de obtención de BioHAp usando temperatura para eliminar el material orgánico presente en los huesos de bovino, en el que el proceso es usado también para huesos de humano y porcino, con este proceso se puede garantizar una remoción casi completa del material orgánico pero la problemática que presenta es que a temperaturas por arriba de 700 °C por fenómeno de coalescencia entre los cristales de hidroxiapatita el tamaño de cristal presenta una transición de nanométrico a micrométrico esto se puede observar claramente en la figura 4, es importante tomar en cuenta esto ya que como la hidroxiapatita que esta naturalmente en los huesos humanos se presenta en el régimen nanométrico no es conveniente usar un tamaño de cristal diferente.

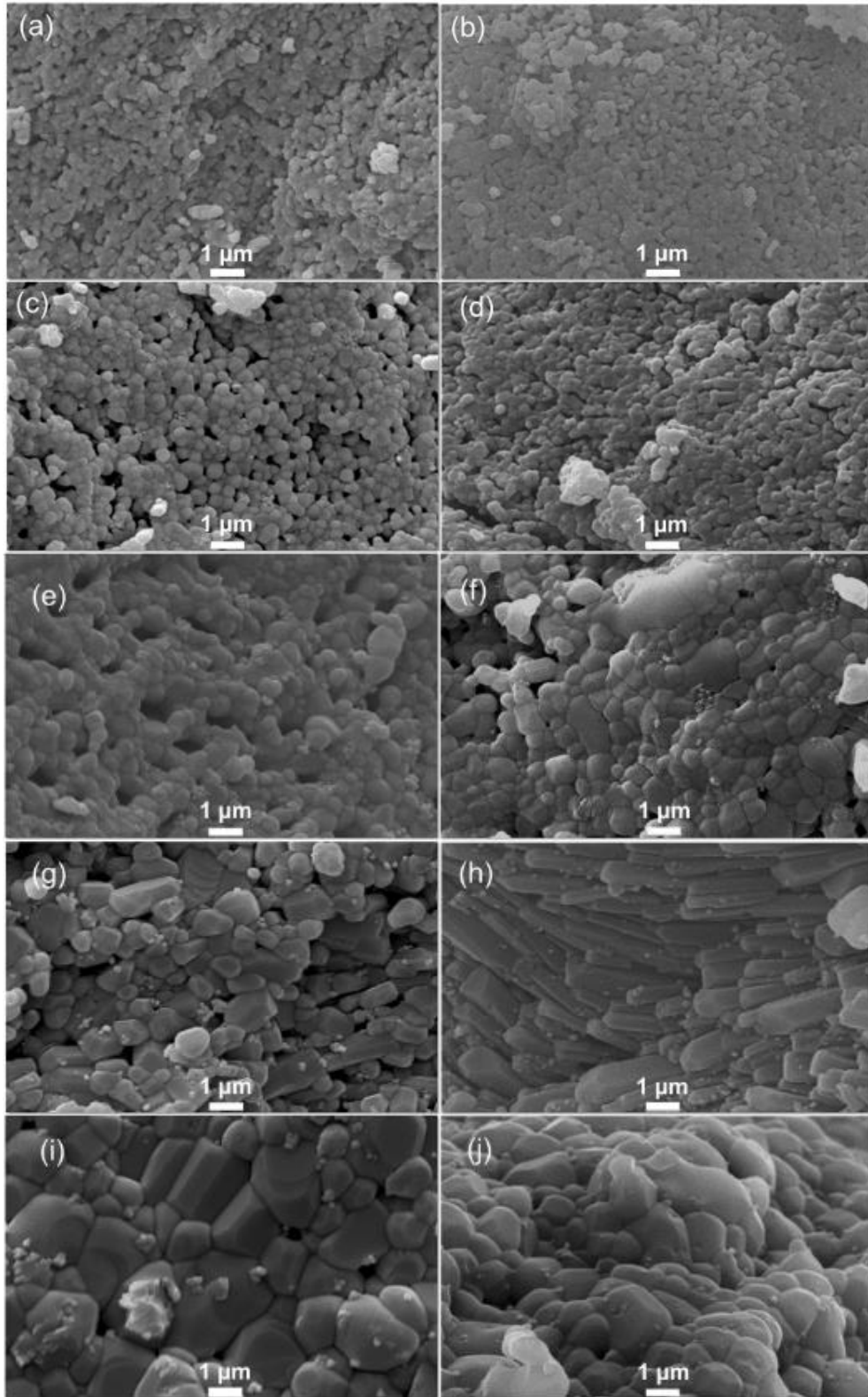


Figura 4.- Micrografías SEM de BioHAp obtenida por procesos de calcinación 700 a 1100 °C [24]

Por otro lado, Barakat et al., [4] presento 3 métodos para la eliminación del material orgánico de la BioHAp el primero es proceso de agua subcrítica; el cual consta de poner una mezcla de agua desionizada con hueso de bovino triturado en un crisol de teflón dentro de una autoclave de acero inoxidable retirando el oxígeno con nitrógeno y se calienta a temperaturas alrededor de 250 °C y luego se enfría utilizando agua fría.

El otro método es hidrólisis hidrotermal alcalina, el cual utiliza una base fuerte como hidróxido de sodio para poder promover la hidrólisis del colágeno en las mismas condiciones que el método de agua subcrítica a diferencia del reemplazo del agua destilada por una solución de hidróxido de sodio. Finalmente, también presento un método de descomposición térmica que se refiere a utilizar temperatura para descomponer los materiales orgánicos en este caso la temperatura utilizada fue de 750 °C.

En los tres métodos presentados se menciona que son métodos fáciles de usar a gran escala en el que se elimina la mayoría del material genético, pero existe una diferencia en el proceso descomposición térmica en el que presenta un tamaño y morfología diferente a las otras dos rutas.

2.3.2 Obtención a Partir de Rutas Químicas

Existen diversos métodos a partir de los cuáles es posible obtener hidroxiapatita, los cuáles se pueden clasificar como: vía húmeda y estado sólido. Entre los métodos de Vía Húmeda los cuales son los más utilizados destacan los de sol-gel, hidrotermal y precipitación química y reacción en estado sólido, mecano-química conforman los métodos de estado sólido. [19]

2.3.2.1 Método de Sol-Gel

El método de Sol-Gel presenta atención debido a sus ventajas para generar polvos de vidrio, vitrocerámicas y cerámicas. Estas ventajas incluyen una mezcla homogénea de las moléculas, temperaturas bajas de reacción la capacidad de generar partículas nanométricas y la flexibilidad de generar polvos nanocristalinos, así como películas delgadas.

En la síntesis de HAp uno de los mayores problemas de este método es el costo de los precursores a base de alcóxido utilizados que son los encargados de reaccionar para formar el gel que posterior se somete a procesos de calcinación para promover la formación de la fase de HAp. Por esta razón se ha tenido un enfoque en la utilización de materiales que sean menos costosos y que con el proceso de sol-gel se garantice obtener la fase pura de hidroxiapatita. [25]

2.3.2.2 Método Hidrotermal

Otro de los métodos que han tenido interés en la síntesis de nanomateriales ha sido el método hidrotermal ya que se dice que es una ruta no tan tradicional para obtener nanoestructuras, nanopolvos y cristales de diferentes materiales [26].

En la obtención de HAp se ha utilizado por su relativa facilidad de síntesis, en el que unos de los parámetros más importantes a considerar es la concentración de los reactivos utilizados en la reacción, así como el pH de las soluciones y las bajas temperaturas utilizadas, esto es importante en la morfología final ya que el crecimiento de la HAp por este método es en nano barras de tamaños que van de diámetros de 15-40 nm y longitudes de 70-150 nm. [27]

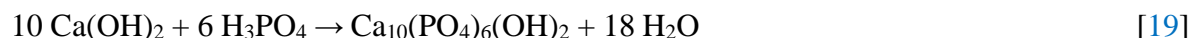
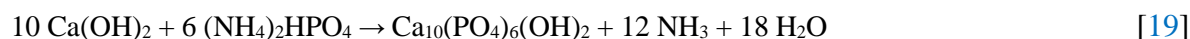
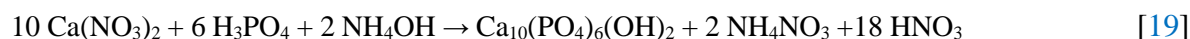
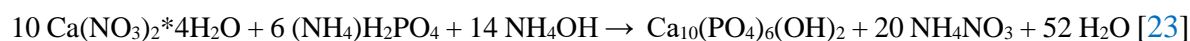
2.3.2.3 Método de Precipitación Química

El método de precipitación química es considerado un método de muy versátil y que presenta muchas ventajas en cuanto a costos de producción y la relación que tiene en producción en masa [28]. En cuanto a producción de nanomateriales ha sido ampliamente usando para la obtención de nanopartículas de diferentes tipos, pero en cuanto a producción de HAp se tiene definidos de manera particular todos los parámetros como pH de la reacción que se controla usando hidróxido de amonio (NH_4OH), temperatura de reacción, tiempo de agitación, tiempo de envejecimiento y temperatura de calcinación involucrados para la producción de este nanomaterial así como sus morfologías que se pueden obtener y tamaños para la aplicación biomédica.

Así mismo está bien definida el proceso de síntesis y los pasos involucrados después de la precipitación que es la agitación, envejecimiento y el proceso de calcinación que es necesario para eliminar los subproductos de la reacción de formación. [29]

Sin embargo recientemente Correa-Piña et al., [23] demostró que la HAp sintética se puede calcinar a temperaturas por debajo de 720 °C que se asocia el fenómeno de coalescencia, así se garantiza que el tamaño de partícula estará en el régimen nanométrico.

En este método los precursores pueden ser distintos en los que siempre se pueda mantener la relación estequiométrica de la HAp de 1.67, las siguientes reacciones de formación muestran los precursores que pueden ser utilizados en este método de síntesis:



2.3.2.4 Método de Reacción en Estado Sólido

El método de reacción en estado sólido tiene como principio la descomposición de un sólido mezclado, suministrando calor para la formación de un producto, ya sean nuevos sólidos o gases. En la obtención de HAp se dice que es un método simple en el que solamente se tiene que mezclar los precursores de Ca^{2+} y PO_4^{3-} en estado sólido y sometidos a un proceso de calcinación para la formación de la HAp. [28]

El mecanismo de este método es por difusión de los iones de los precursores con una posterior calcinación a altas temperaturas, [30] que sin embargo es la principal problemática que presenta este proceso ya que como se mencionó con anterioridad a altas temperaturas los cristales de HAp sufren un fenómeno de coalescencia pasando de un tamaño nanométrico a uno micrométrico. [2]

2.3.2.5 Método de Mecano-Química

Esta técnica de mecano-química tiene en común con la reacción en estado sólido que para que exista reacción de formación no es a partir de soluciones con los precursores, si no que aquí está presente compresión, cizallamiento, o fricción mediante trituración de los precursores para inducir a que se genere la reacción de formación. Las técnicas mecano-químicas suelen utilizar molinos de bolas o molinos planetarios a determinadas velocidades o frecuencias. La compresión de alto impacto y el aumento de la temperatura local durante la reacción mecano-química contribuyen a la reacción química y mejoran el proceso de difusión [31-34].

Otra de las limitaciones de este proceso es que como las sustancias a veces están expuestas al ambiente y a la humedad presente en éste, los procesos del método de mecano-química siempre se lleva en recipientes sellados que por lo regular son de acero inoxidable, zirconio, ágata, etc. [31]. En comparación con el método de estado sólido las partículas obtenidas por este proceso suelen ser formas irregulares con partículas no homogéneas, [19] los factores a tomar en cuenta en este método es que se tienen que utilizar precursores que sean lo más estables posibles y que no presenten hidratación, así como lo tiempos de molienda que es lo que se puede variar para saber cuál es el tiempo óptimo en el cual la mayor parte de los reactivos se transforman en productos y la relación en peso entre los reactivos.

En la síntesis de HAp se ha utilizado Ca(OH)_2 con P_2O_5 y CaF en el que se obtuvo una fase de HAp con flúor, en este trabajo se reporta que el tiempo en que se obtuvo toda la fase de fluoroapatita es de hasta 6h lo que involucra bastante tiempo en la reacción de formación. [35]

2.3.3 Obtención a Partir de Procesos Combinados

Este tipo de obtención ha tomado un amplio interés ya que se puede aprovechar la composición de materiales que pueden ser considerados desechos para poder transformarlos en nanomateriales. En obtención de HAp que se han utilizado precursores que principalmente contengan calcio o fósforo que es la composición elemental de la hidroxiapatita, a partir de esto, se mezcla con reactivos utilizados en las rutas de síntesis química y utilizando los principios de la técnica de síntesis se obtiene el producto final, clasificándose:

2.3.3.1 Precursores a Partir de Cáscara de Huevo.

Otra de las formas de obtener hidroxiapatita es utilizando bioresiduos naturales que realicen la función de un precursor y que contengan una alta composición en iones de que sean utilizados en la síntesis de HAp, esto se refiere a utilizar precursores de fuentes naturales e combinación con los procesos de síntesis química como los antes mencionado, uno de los ejemplos más claros es la utilización de cáscara de huevo debido a que es un desecho muy común en la población gracias a que el huevo es uno de los alimentos presentes en la dieta de la mayoría de la población.[36]

La utilización de la cáscara de huevo se debe a su composición química ya que este bioresiduo se compone en un 96% de su peso total de carbonato de calcio (CaCO_3) el cuál es el polimorfo de calcio más estable a presión atmosférica y temperatura ambiente, de un 2% en peso de una matriz orgánica que contiene proteínas y lípidos y el resto se compone de iones como Na^{+1} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+3} , Al^{+3} , Sr^{+2} , entre otros, [15] Los cuales se presentan en cantidades similares a las cantidades de iones que hay en la BioHAp de huesos humanos, bovinos y porcinos. [2]

Para obtener el precursor utilizado en la síntesis de HAp de acuerdo con Galván-Ruiz et al., [37] donde caracterizó el ciclo de la cal a partir de CaCO_3 mineral donde obtuvo Ca(OH)_2 a partir de CaO obtenido de la eliminación de CO_2 del carbonato de calcio y luego hidratar el CaO para poder inducir a la formación de Ca(OH)_2 , $\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{CaO} \rightarrow \text{Ca(OH)}_2$. Se puede

seguir este mismo proceso a partir de las cáscaras de huevo ya que como se mencionó anteriormente la composición mayoritaria de este material es CaCO_3 .

2.3.3.2 Precursores a Partir de Diferentes Fuentes Utilizadas como Precursores

Existen también otras fuentes de las que se puede obtener HAp a partir de bioresiduos que estén principalmente compuestos por los elementos principales de la HAp, uno de ellos que son las estrellas de mar así como las conchas de mar que al igual que las cáscaras de huevo están compuestas mayoritariamente por calcio en este sentido se puede aprovechar este componente que al combinarlo con precursores de fosfato se puede dar la reacción de formación y obtener HAp de diferentes morfologías y tamaños. [19]

En la figura 5 podemos observar las diferentes fuentes de las que podemos obtener HAp en las que están presentes diversos bioresiduos que se pueden utilizar como fuentes de Ca^{2+} y que sirven para combinar los procesos de síntesis, así como las morfologías obtenidas a partir del precursor o fuente utilizado.

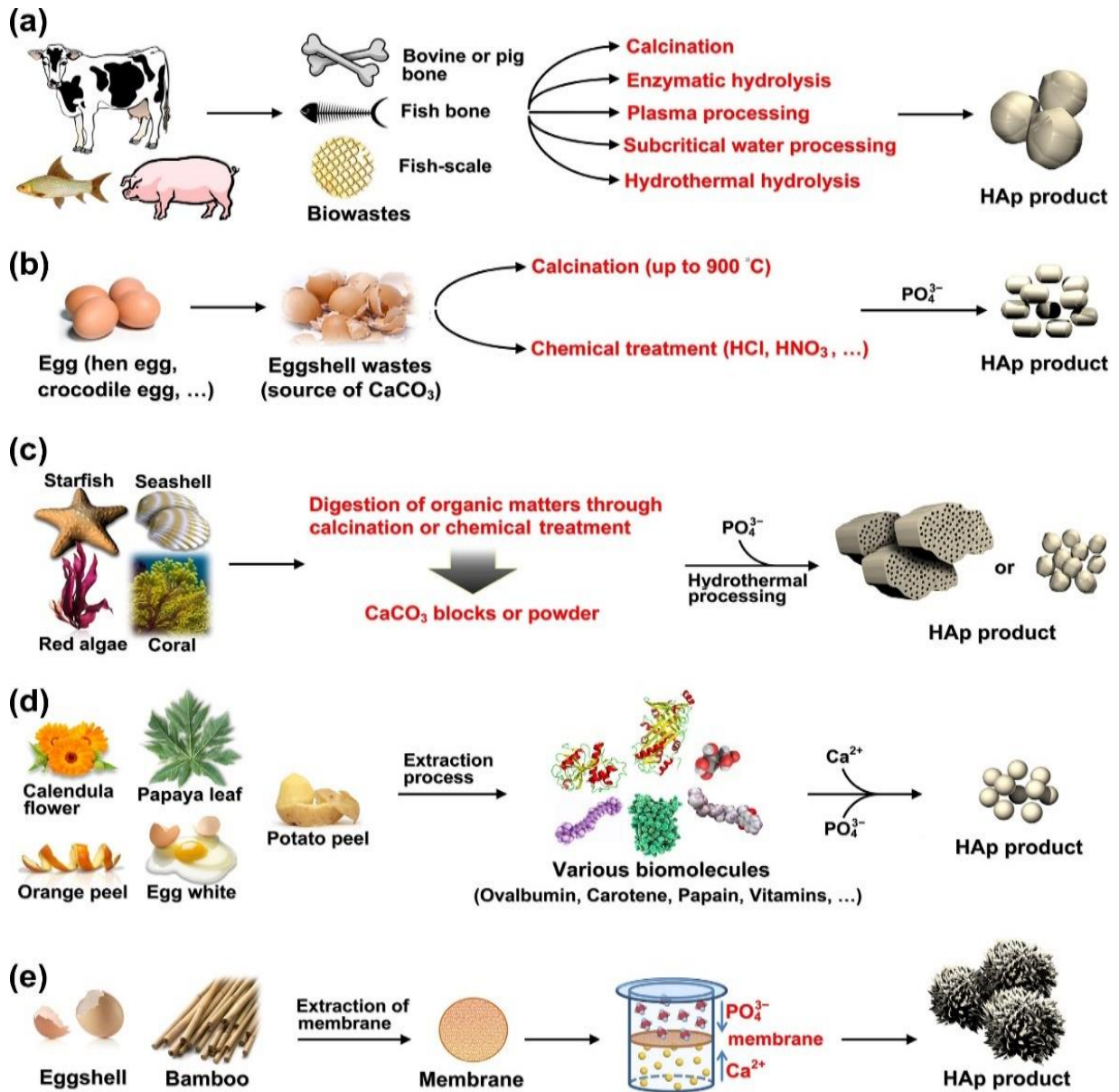


Figura 5.- Diferentes rutas en las que se puede obtener HAp a partir de fuentes naturales [19]

2.4 TECNICAS DE CARACTERIZACIÓN

2.4.1 Análisis Térmico (TGA/DSC)

El calor es una de las propiedades de todos los materiales, y es una capacidad que se puede transferir en forma de energía de un sistema físico a otro y esto involucra pérdida y ganancia de energía entre los sistemas. En resumen, la temperatura es una medida de la capacidad de cualquier sistema físico, para transferir energía térmica a otro sistema físico. De esta manera las leyes de la termodinámica son las que toman importancia ya que son las que rigen estos fenómenos de transferencias de energía en forma de calor en los sistemas físicos. Por ejemplo, si dos objetos, o si un sistema y sus alrededores, tienen una temperatura diferente, entonces tienen una capacidad diferente para transferir calor. Con el tiempo, habrá un flujo de energía del objeto más caliente al objeto más frío, lo cual está denominado por la ley cero de la termodinámica que anuncia el equilibrio térmico.

Esto nos dice que al someter un material a un proceso de calentamiento en el que se involucra temperatura éste va a experimentar eventos térmicos dependiendo de su naturaleza, y generalmente cuando esto ocurre induce a que el material tenga mayor energía cinética provocando mayor movimiento en sus estructuras y así mismo suceda un cambio en su estructura o que reduzcan su cantidad de masa convirtiéndose en diferentes componentes debido al rompimiento de los enlaces químicos.

En los análisis térmicos de los materiales, como ya se mencionó una de las variables con mayor importancia es la masa del material ya que estos tipos de análisis se hacen respecto a la diferencia de pérdida de masa (TGA) y a las diferentes transiciones de liberación y absorción de calor (DSC).

El análisis termogravimétrico (TGA) se utiliza a menudo en estudios de descomposición térmica de biomasa. Por ejemplo, con este método podríamos estudiar la pirólisis de sustancias en diversas condiciones y velocidades de calentamiento. La medida instrumental en algunos casos puede dar como resultado el termograma a partir del cual resulta el termogravimétrico diferencial (DTG) del cual se hacen suposiciones sobre las velocidades de reacción y de los diversos pasos del tratamiento térmico en cuanto a pérdida de masa.

El fundamento sobre la base de este tipo de medidas es la variación de peso de la muestra como consecuencia del tratamiento térmico. Debido al proceso, se perderá algo de masa en términos de volátiles o descomposición y esta pérdida de peso se mide normalmente por medio de una micro balanza, este principio lo podemos ver en la figura 6 a) donde se muestra esquemáticamente los componentes principales del análisis TGA.

El análisis termogravimétrico (TGA) puede también ser combinado con el análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) el cuál sirve para tener un análisis térmico más completo debido a que esta técnica nos ayuda a mostrar las transiciones endotérmicas y exotérmicas del material respecto al incremento de temperatura, en ambos casos el análisis se hace con una muestra a la cual se va a hacer el tratamiento térmico y una muestra de referencia. [38]

En la figura 6 c) podemos observar un termograma de ejemplo en el cual están presentes tanto la gráfica de TGA (negro) que muestra la pérdida de masa respecto a la temperatura y la gráfica de DSC (azul) que nos indica las transiciones exotérmicas (máximos) y endotérmicas (mínimos) también respecto a la temperatura suministrada. Como se mencionó estas dos técnicas se pueden hacer simultáneamente es por esto que hoy en día se utilizan equipos en los que podemos realizar esta técnica al mismo tiempo, un ejemplo de estos equipos los podemos ver en la figura 6 b) el cual es un equipo TGA/DSC de Mettler Toledo.

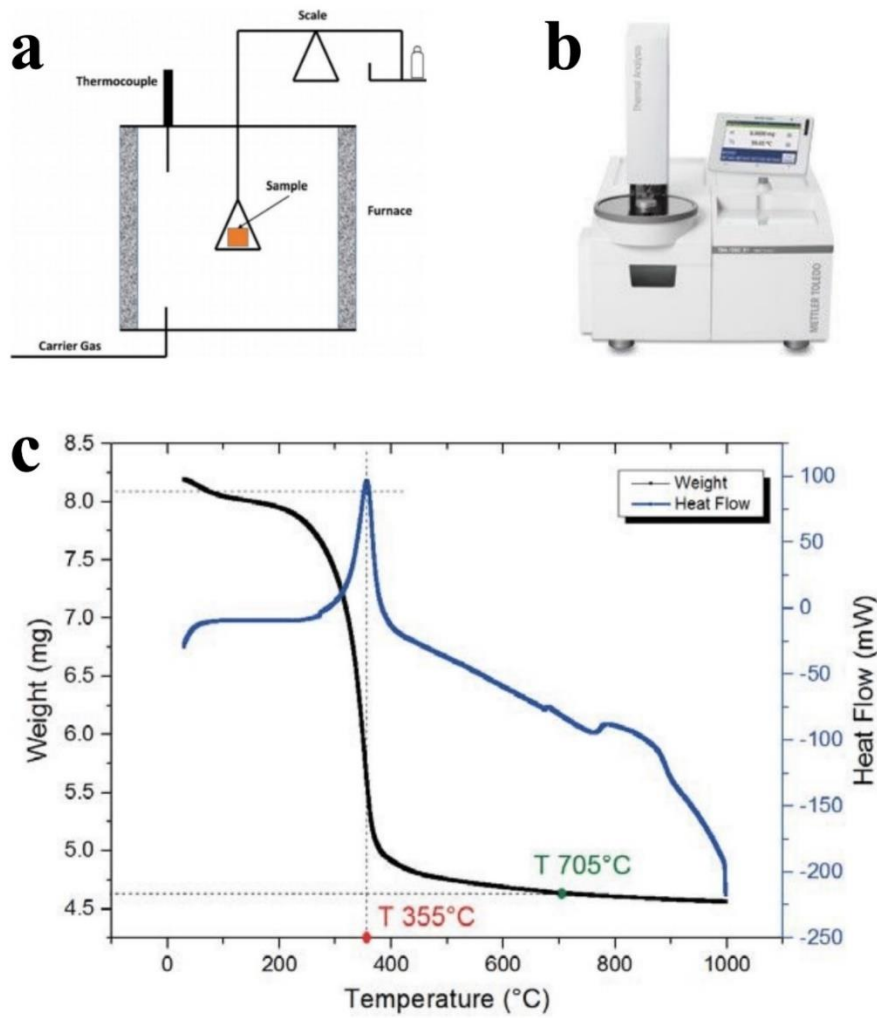


Figura 6.- a) Principio de la técnica TGA/DSC, b) Equipo que se utiliza para realizar TGA/DSC simultáneamente y c) Ejemplo de graficas TGA/DSC [38]

2.4.2 Difracción de Rayos X (DRX)

Los Rayos X fueron descubiertos por el físico alemán W.C. Röntgen en 1895 y fueron llamados así porque desconocía la naturaleza de la radiación, por tal descubrimiento recibió el premio Nobel en el año de 1901. Pero no fue hasta 1912 cuando von Laue físico alemán en un experimento con cristales de Sulfato de Cobre pudo observar la difracción de los rayos X, así con este experimento se pudo demostrar la naturaleza ondulatoria de los rayos X, que a partir de esto pasó a formar parte del espectro electromagnético.

Los rayos-X son radiación electromagnética de la misma naturaleza que la luz, pero de longitud de onda (λ) mucho más corta. La unidad de medida en la región de los rayos-X es el angstrom (\AA), igual a 10^{-10} m (Figura 7) y los rayos X usados en difracción tienen longitudes de onda en el rango $0.5\text{-}2.5 \text{\AA}$ mientras que la longitud de onda de la luz visible está en el orden de 6000\AA . [39]

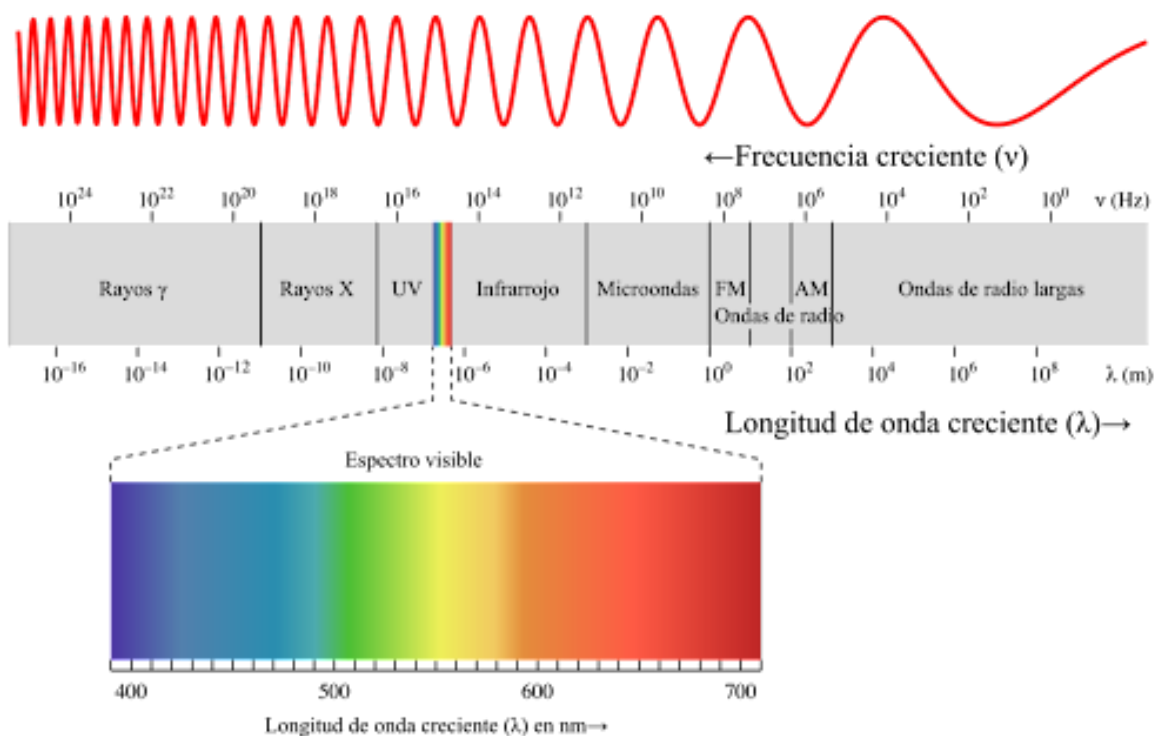


Figura 7.- Espectro Electromagnético

Los rayos X se producen cuando una partícula cargada eléctricamente con suficiente energía cinética de alrededor de 1 keV colisiona con otro átomo lo que produce un espectro continuo a partir de la longitud de onda que depende de la energía a la cual son emitidos los electrones a esto se le denomina radiación continua, también, a partir de esto se generan rayos X monocromáticos, que esto es característico del material y se conoce como línea de emisión característica que se generan a la longitud de onda más corta (SWL). (figura 8)

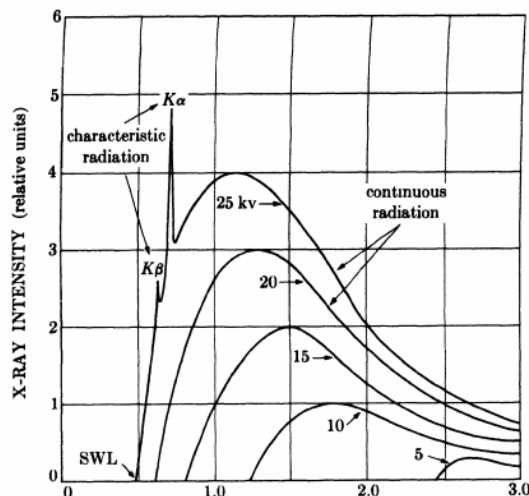


Figura 8.- Radiación continua y radiación característica de los rayos X [39]

Estas líneas de emisión conocido como espectro característico son generadas a partir de que en un átomo que está compuesto por diferentes niveles de capas de electrones que partiendo del núcleo al exterior se denominan K , L , M , etc., así cuando a radiación incide y libera un electrón de la capa K un electrón de la capa L lo reemplaza haciendo una transición

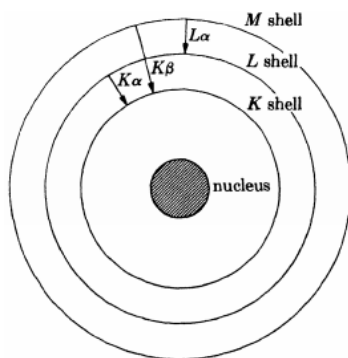


Figura 9.- Esquema de la transición de nivel de un electrón [39]

de nivel de energía de menor energía a mayor y esto produce que se emita rayos X característicos $K\alpha$, de igual manera si el haz incidente libera un electrón de la capa L un electrón de la capa siguiente que en este caso sería la capa M da una transición de nivel de energía para así ocupara el lugar vacío, en este caso se producen rayos x característicos $L\alpha$ y de esta manera podemos obtener diferentes líneas de emisión característica como se puede observar en la figura 9.

Esta interacción de la radiación con la materia fue establecida principalmente por la ley de Bragg la cual define la difracción de los rayos X en las estructuras cristalinas ya que se establece que la estructura de un cristal está compuesta por muchas capas de planos que está formada por átomos que se encuentran a la misma distancia y que al irradiar una longitud de onda de rayos X, el mismo ángulo en el cual incide va a ser el mismo ángulo de difracción [40]. A partir de aquí se establece la ley de Bragg la cual se define como la ecuación (1):

$$n\lambda = 2d_{hkl} \text{Sen}\theta \quad (1)$$

Donde λ es la longitud de onda de los rayos X, n es el orden de reflexión, d_{hkl} es la distancia entre los planos en la red de la estructura cristalina y θ es el ángulo de incidencia/difracción de los planos (ver en la figura 10). Esto ocurre cuando inciden los haces en fase 1 y 2 y difractan en 1' y 2', la diferencia de los caminos ópticos en la incidencia de dichos haces en dos planos de la red definidos por la distancia entre AB y BC y considerando que esta suma es un número entero (n) de veces la longitud de onda (λ).

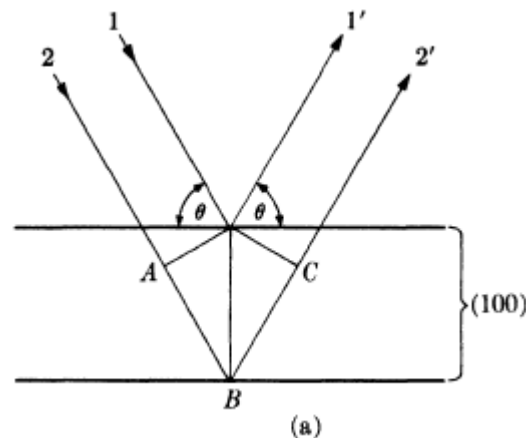


Figura 10.- Ley de Bragg en plano (100) [39]

A partir de esto se tiene:

$$(AB + BC) = n\lambda \quad (2)$$

Y como:

$$AB = BC \quad (3)$$

Considerando:

$$\text{Sen } \theta = \frac{AB}{d} \quad (4)$$

Entonces:

$$(AB + BC) = (d_{hkl}\text{Sen}\theta + d_{hkl}\text{Sen}\theta) = 2d_{hkl}\text{Sen}\theta \quad (5)$$

$$2d_{hkl}\text{Sen}\theta = n\lambda \quad (6)$$

Experimentalmente la ley de Bragg puede ser utilizada usando rayos X de longitud de onda conocida y midiendo el ángulo θ de difracción experimental, con esta medida podemos determinar la distancia interplanar d de varios de los planos en el cristal, a esto se le conoce como análisis estructural lo cual nos ayuda con la determinación de las fases presentes en el material que se analiza.

En la figura 11 podemos observar el principio de la técnica de difracción de rayos X, en donde la radiación es producida desde T, incidiendo en la muestra C con un ángulo determinada y con una difracción del mismo ángulo de incidencia.

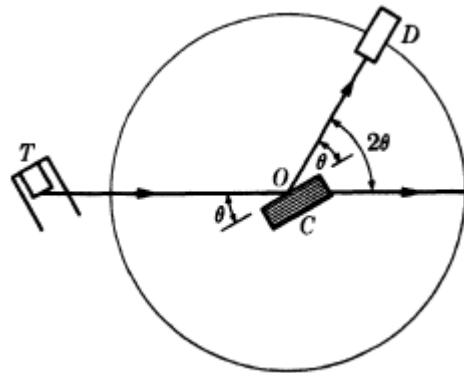


Figura 11.- Principio de la técnica de Difracción de Rayos X [39]

A partir de esta técnica podemos obtener un patrón de difracción de los diferentes picos característicos de un material (figura 12). De esto podemos obtener información como; que fases están presentes en el material, su tipo de cristalinidad a partir de los anchos de picos difractados tamaño de cristal con las ecuaciones de Scherrer y Williamson-Hall. Un ejemplo del patrón de difracción lo podemos observar en la figura 12 en donde podemos ver a diferencia entre cristales y sólidos amorfos.

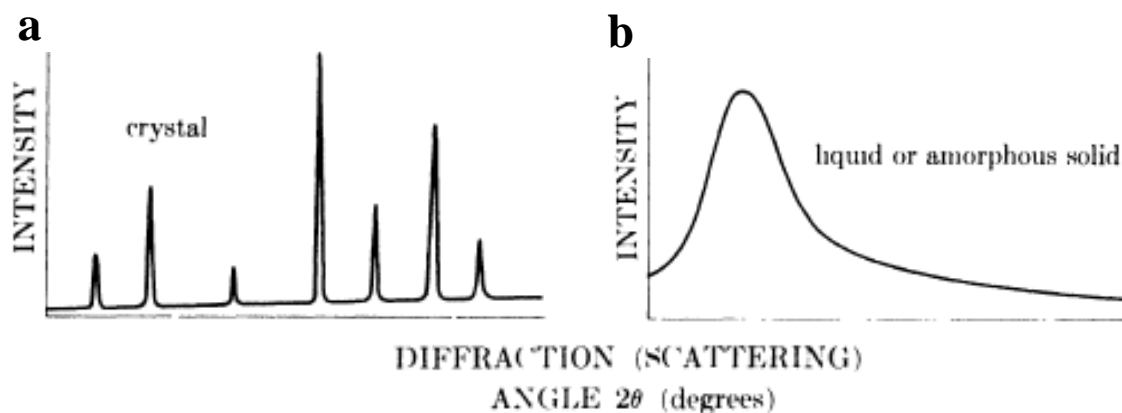


Figura 12.- Patrón de difracción de rayos X, a) material cristalino, b) material amorfo [40]

2.4.3 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia de absorción infrarroja (IR) recibe su nombre debido a la región del espectro electromagnético implicado que va desde 12800cm^{-1} - 10 cm^{-1} (figura 7), que se divide en tres zonas: IR cercano (NIR): $12800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, IR medio: $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, e IR lejano: $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$. Siendo en el IR medio donde se dan la mayoría las aplicaciones analíticas tradicionales. El NIR requiere una mínima o nula preparación de la muestra y ofrece un análisis cuantitativo sin consumirla o destruirla. Por su parte el IR lejano requiere el uso de fuentes y materiales ópticos especiales.

El IR es utilizado para el análisis de compuestos orgánicos, inorgánicos u organometálicos que contengan átomos pesados (masa atómica superior a 19) y proporciona información útil en estudios estructurales [41].

Una de las grandes ventajas de la espectroscopia IR es su versatilidad, ya que permite estudiar prácticamente cualquier muestra con independencia del estado en que se encuentre: líquidos, disoluciones, pastas, polvos, fibras, películas, gases o superficies son algunos ejemplos.

Para que una molécula muestre absorción en el infrarrojo tiene que poseer una característica en específico: un momento dipolar eléctrico debe cambiar durante el movimiento, es decir, la interacción de la radiación infrarroja con la materia origina cambios en los dipolos

moleculares asociados a vibraciones y rotaciones de grupos funcionales presentes en el compuesto en donde el espectro de infrarrojo se da por la absorción de una cierta cantidad de energía de la radiación emitida a la muestra, a estas vibraciones de los enlaces de las moléculas se las denomina modos normales de vibración.

Los modos normales de vibración pueden ser vistas como un cambio en la longitud del enlace (estiramiento) o en el ángulo de unión (flexión), mientras que algunos enlaces pueden estirarse en fase (estiramiento simétrico) o fuera de fase (estiramiento asimétrico), entre otros modos vibracionales [41].

El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de esta molécula. Así, entre otras aplicaciones, el espectro IR se puede usar como “huella dactilar” en la identificación de muestras desconocidas mediante la comparación con espectros de referencia.

En la técnica de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) el instrumento que determina el espectro de absorción de un compuesto se llama espectrofotómetro. El espectrofotómetro de transformada de Fourier proporciona el espectro de infrarrojos mucho más rápidamente en comparación con el espectrofotómetro tradicional ya que éste utiliza el principio de Michelson. El instrumento produce un rayo de radiación IR, que se emite desde una fuente de cuerpo negro incandescente.

Posteriormente, el haz pasa a través del interferómetro donde tiene lugar la codificación espectral. La recombinación de haces con diferentes longitudes de trayectoria en el interferómetro crea una interferencia constructiva y destructiva llamada interferograma. Al final con la ayuda de un software que hace la transformada de Fourier se obtiene el espectro de absorción final de la muestra analizada. [42] Podemos ver este principio en la figura 13.

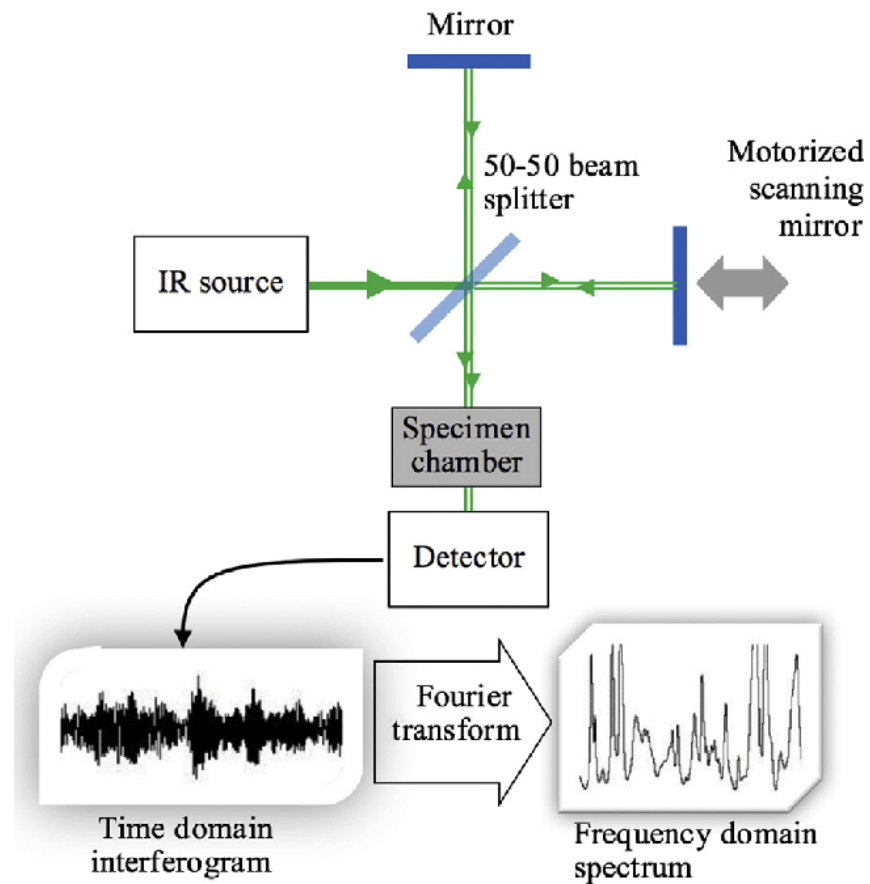


Figura 13.- Principio de la técnica FTIR [43]

2.4.4 Microscopia Electrónica de Barrido de Alta Resolución (HR-SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es uno de los instrumentos más versátiles disponibles para el examen y análisis de la morfología de la microestructura y las caracterizaciones de la composición química. [44]

Esta técnica consiste en la interacción de un haz de electrones producido por un filamento caliente generalmente de tungsteno y una determinada área del material a estudiar, generando diferentes señales como la de electrones secundarios y retrodispersados, los cuales se diferencian por su energía. Los electrones secundarios son generados por interacciones

inelásticas, tienen una energía inferior a 50 eV y son utilizados para la formación de la imagen.

Mientras que los electrones retrodispersados se dan por dispersiones elásticas, responden a la composición elemental de la muestra, generando un contraste por número atómico (zonas con número atómico menor se verán más oscuras). El resultado mediante SEM será una imagen digital que dependiendo del equipo se puede lograr una resolución de hasta 5 nm como es el caso de microscopía electrónica de barrido de alta resolución (HR-SEM).

Las muestras deben de ser conductoras para poder ser analizadas, cuando éstas no lo son se les hace un recubrimiento con algún material conductor como el oro. En algunos casos y dependiendo del equipo las muestras deben estar libres de humedad, por lo que en ocasiones es necesario realizarles un proceso de deshidratación [45]

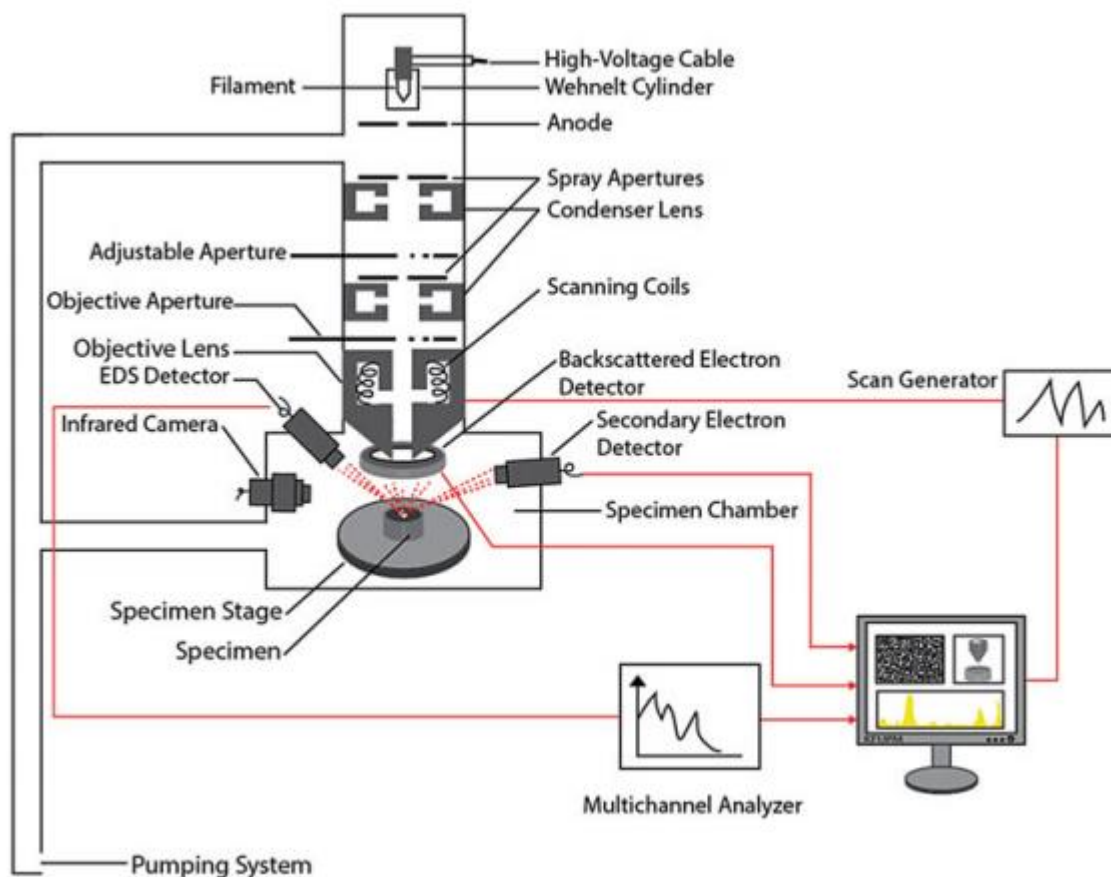


Figura 14.- Esquema de las partes del Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) [46]

La figura 14 muestra un esquema de las partes que compone un microscopio electrónico de barrido en el que para poder generar las imágenes consta de lo siguiente:

Un cañón de electrones que genera un haz de electrones a partir de calentar un filamento de que comúnmente es de tungsteno y por medio de una diferencia de potencial provocado por un ánodo los electrones se disparan esta parte se encuentra en la parte superior de la columna. Las lentes electromagnéticas ubicadas dentro de la columna enfocan el haz de un pequeño diámetro que está en el régimen de los nanómetros. Las bobinas de exploración en la columna barren el haz sobre la superficie de la muestra presente en la cámara que se encuentra al final de la columna. La pistola, la columna y la cámara de muestras se mantienen al vacío para permitir la generación y el avance del haz de electrones. Los electrones en el haz penetran unas pocas micras en la superficie de una muestra a granel, interactúan con sus átomos y generan una variedad de señales como electrones secundarios y retrodispersados y rayos X característicos que se recolectan y procesan para obtener imágenes y química de la superficie de la muestra. La resolución lateral última de la imagen obtenida en el SEM corresponde al diámetro del haz de electrones. Los avances en el diseño de lentes y cañones de electrones producen diámetros de haz muy finos que dan resoluciones de imagen del orden de <1 nm. [46]

2.4.5 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

La dispersión dinámica de luz (DLS) es el conjunto de técnicas más versátil y útil para medir los tamaños, distribuciones de tamaño y (en algunos casos) las formas de nanopartículas en líquidos. La técnica DLS es una técnica "hidrodinámica" en el sentido de que mide directamente cantidades hidrodinámicas, generalmente los coeficientes de difusión traslacional y/o rotacional, que luego se relacionan con tamaños y formas a través de relaciones teóricas. [47]

Esta técnica utiliza la iluminación de una suspensión de partículas o moléculas que experimentan un movimiento browniano mediante un rayo láser. Las fluctuaciones dependientes del tiempo en la intensidad de la luz dispersa que se producen se analizan utilizando un auto correlacionador que determina la función de autocorrelación de la señal.

La correlación de la señal, G, decae a una tasa exponencial que depende de la difusión de las partículas que se miden como se muestra en la ecuación 7.

$$G = \int_0^{\infty} I(t)I(t + \tau) dt = B + Ae^{-2q^2D\tau} \quad (7)$$

Donde B es la línea de base, A es la amplitud y D es el coeficiente de difusión traslacional. La dispersión El vector de dispersión (q) se define mediante la siguiente ecuación, donde ñ es el índice de refracción del solvente, λ_0 es la longitud de onda de vacío del láser y θ es el ángulo de dispersión:

$$q = \frac{4 \pi \tilde{n}}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (8)$$

La velocidad de este movimiento browniano se mide y proporciona el coeficiente de difusión traslacional D. Este coeficiente de difusión se puede convertir en un diámetro hidrodinámico (D_H) usando la ecuación de Stokes-Einstein.

$$D_H = \frac{kT}{3 \pi \eta D} \quad (9)$$

Donde k es la constante de Boltzman, T la temperatura y η es la viscosidad dispersante. El límite de tamaño inferior de la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) depende de la cantidad de luz dispersada en exceso. Este exceso es la diferencia de dispersión entre la molécula o partícula en estudio y el dispersante en el que se prepara. [48]

En la figura 15 podemos ver un esquema de los componentes principales de la técnica de DLS en la que consta de la fuente generadora del haz de luz que pasa por un lente que condensa el haz en una onda monocromática la cual incide en la muestra que está en forma de dispersión coloidal, de aquí el haz dispersado a un ángulo θ de la dirección de incidencia se vuelve a concentrar con ayuda de otro lente que lo manda al detector el cual se encarga con ayuda de un correlacionador a transformar la señal en los datos finales [49]

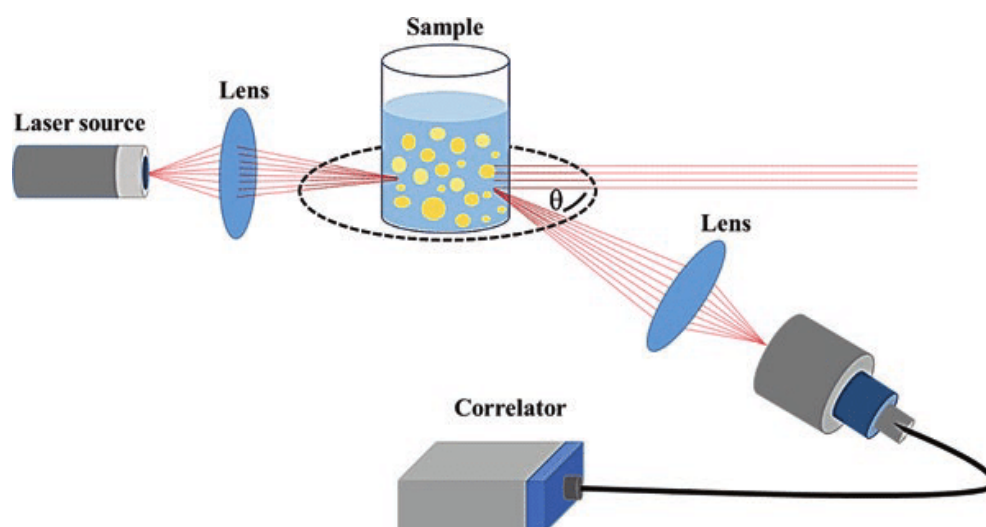


Figura 15.- Esquema de la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) [49]

2.4.6 Espectroscopía de Emisión Óptica con Plasma de Acoplamiento por Inducción (ICP-OES)

La espectroscopía de emisión óptica con plasma de acoplamiento por inducción (ICP - OES) es una herramienta poderosa para la determinación de metales en diferentes matrices. Se pueden realizar mediciones de un solo elemento rentable con un monocromador simple/combinación de tubo fotomultiplicador (PMT) o simultáneamente hasta 70 elementos con la combinación de un policromado y un detector de matriz. El rendimiento analítico es muy bueno en comparación con otras técnicas de análisis inorgánicos, especialmente con respecto al rendimiento de la muestra y sensibilidad [50].

La muestra generalmente se transporta al instrumento como una muestra líquida. Las muestras en forma de líquido o gas se pueden inyectar de forma directa en el equipo, mientras que las muestras sólidas normalmente se requieren extracción o digestión ácida empleando HNO_3 y HCl para que los analitos (elemento, compuesto o ion) estén presentes en una solución líquida para posteriormente ser introducidos en el equipo.

Dentro del cual el líquido se convierte en un aerosol a través de un proceso conocido como nebulización. La muestra de aerosol es luego transportada al plasma donde se desolvata, vaporizado, atomizado y excitada y/o ionizado por el plasma.

Posteriormente los espectros son separados en sus diferentes longitudes de onda individuales para poder identificar la emisión de cada especie excitada y su intensidad mediante un sistema de monocromadores y policromadores. Para la detención real de la luz, después de haber separado las longitudes de onda de otras, se utiliza un detector fotosensible tal como un tubo fotomultiplicador (PMT) o técnicas de detención avanzadas tales como un dispositivo de inyección de carga (CID) o un dispositivo de carga. La radiación detectada se convierte en señales electrónicas que a su vez se convierte en información que es procesada por un sistema informático, esto lo podemos observar en la figura 16.

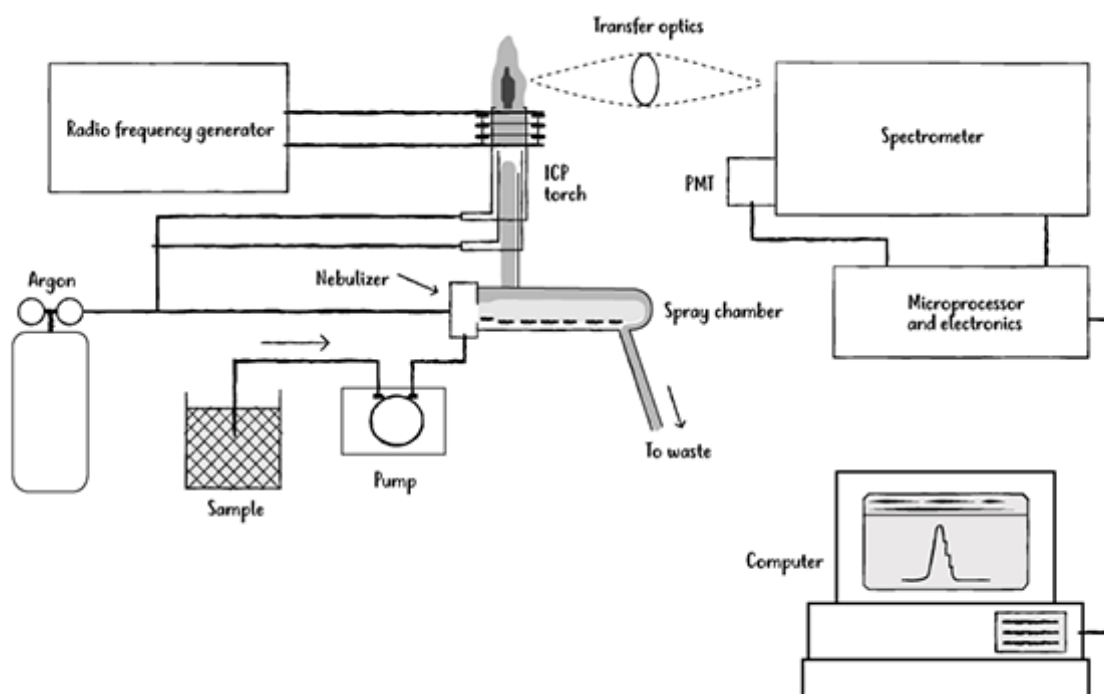


Figura 8.- Esquema de la técnica de ICP-OES [50]

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 METODOLOGÍA

3.1.1 Obtención De Hidróxido De Calcio A Partir De Cáscara De Huevo

Como inicio del proceso de obtención de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, se hirvieron las cáscaras de huevo de gallina en agua destilada para eliminar las impurezas y la membrana proteica, después se secaron y se trituraron con un mortero de acero inoxidable y se tamizaron con una maya de 150 micrómetros. A continuación, estas cáscaras de huevo se analizaron mediante análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido (ver figura 24). Con base en los resultados, se calcinaron cáscaras de huevo limpias a 550 y 950 °C para obtener CaCO_3 y CaO , respectivamente. La cáscara de huevo calcinada a 950 °C se remojó en agua destilada durante 2 meses para obtener $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -E. El diagrama del proceso se muestra en la figura 17.

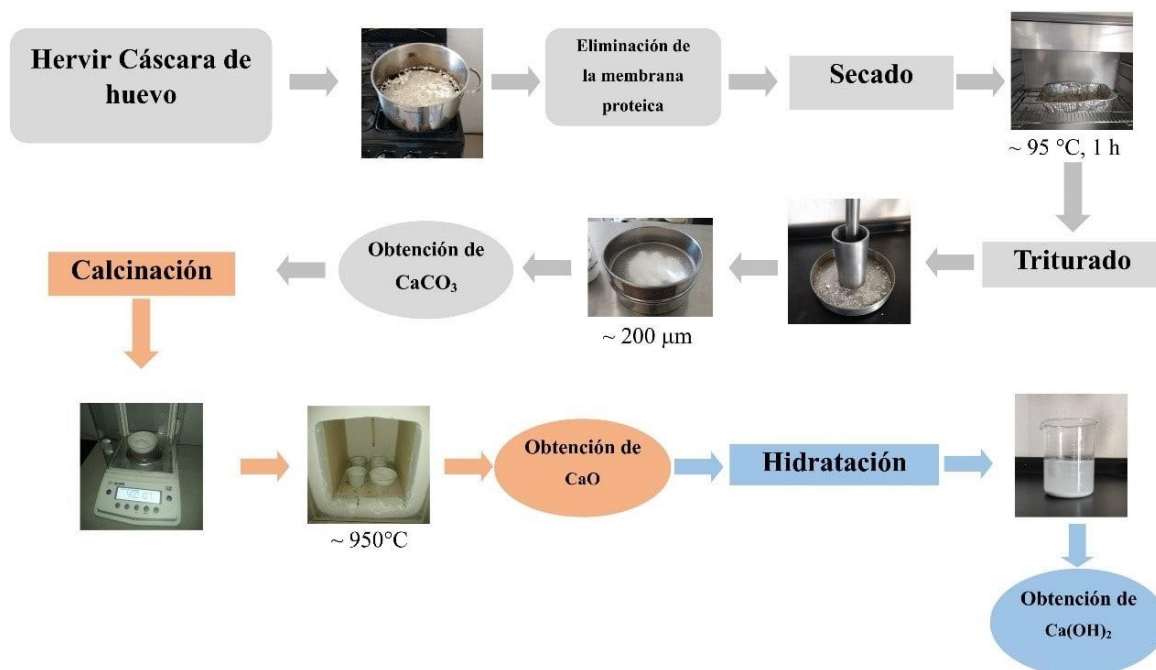


Figura 17.- Diagrama de proceso de obtención de $\text{Ca}(\text{OH})_2$

3.1.2 Síntesis de Hidroxiapatita Usando Hidróxido de Calcio como Precursor

La nanohidroxiapatita se obtuvo mediante el método de precipitación química húmeda reportado por Sadat-Shojai et al. [19] con algunas modificaciones. Se hizo reaccionar $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,6 M (99,1%, J.T. Baker, México; código 0776-01) con 1,0 M de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ obtenido de la cáscara de huevo ($\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-E}$) gota a gota y con agitación constante y calentamiento a $37,5^\circ\text{C}$ usando un baño hidrotérmico con agitación. El $\text{pH} = 9$ se controló añadiendo NH_4OH (28,0-30,0%, J.T. Baker, EE. UU.; código 9721-02) y utilizando un medidor de pH de Hanna Instruments (HI2020). Al final de la reacción se envejeció 48h. Luego, el polvo húmedo se filtró y se secó a 94°C durante 1h. Finalmente, la muestra se pulverizó, se tamizó (malla US 100; $147\ \mu\text{m}$) y se calcinó a 250°C durante 3h para eliminar los subproductos de la reacción. Esta muestra se etiquetó como HAp-E, y se usó una hidroxiapatita comercial de Sigma Aldrich (HAp-C) por razones comparativas. El diagrama de proceso se muestra en la figura 18.

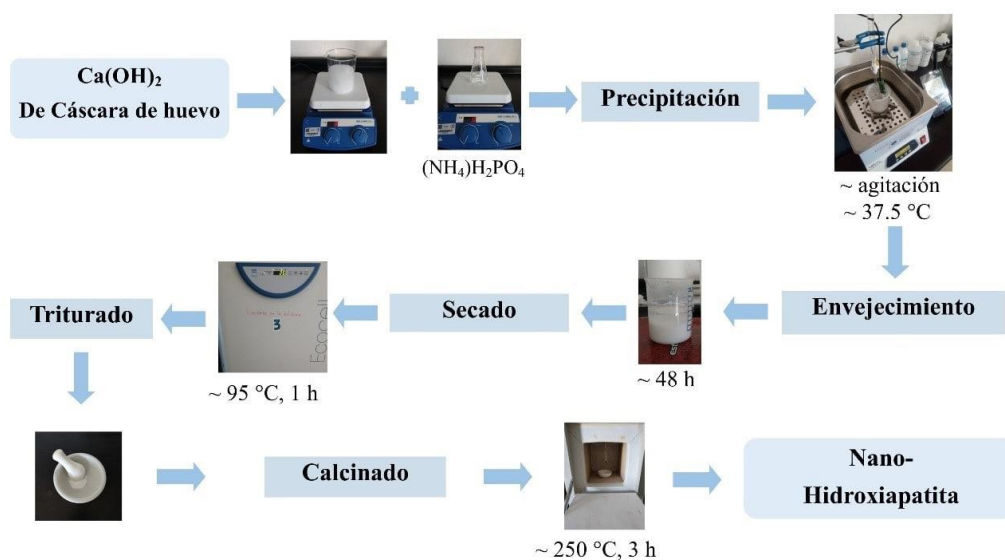


Figura 18.- Diagrama de bloques del proceso de síntesis de hidroxiapatita

3.2 ANÁLISIS TÉRMICO POR TGA/DSC

En el análisis térmico se llevó a cabo en simultaneo en un aparato Mettler Toledo modelo TGA/DSC, como el que se muestra en la figura 6 b).

En donde se colocaron 4 mg de cáscaras de huevo limpias en polvo (74 μm) en un crisol de alúmina y se calentaron desde temperatura ambiente (25 °C) a 900 °C a 5 °C/min en una atmósfera de oxígeno dentro del aparato.

3.3 CARACTERIZACIÓN POR RAYOS X

Los patrones de difracción de rayos X de polvo de muestras comerciales: $\text{CaCO}_3\text{-C}$, CaO-C , $\text{Ca(OH)}_2\text{-C}$ y HAp-C ; los precursores de cáscara de huevo obtenidos: Raw-E (cáscara de huevo sin calcinar), $\text{CaCO}_3\text{-E}$, CaO-E , $\text{Ca(OH)}_2\text{-E}$ y HAp-E se llevaron a cabo con un difractómetro Rigaku Ultima IV (Figura 19) que funciona a 40 kV, 30 mA con una longitud de onda de radiación de CuK de $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$. Se tomaron difractogramas de 15 a 75 en una escala de 2θ y un tamaño de paso de 0,02. Las muestras de polvo se empaquetaron densamente en un fondo cero.

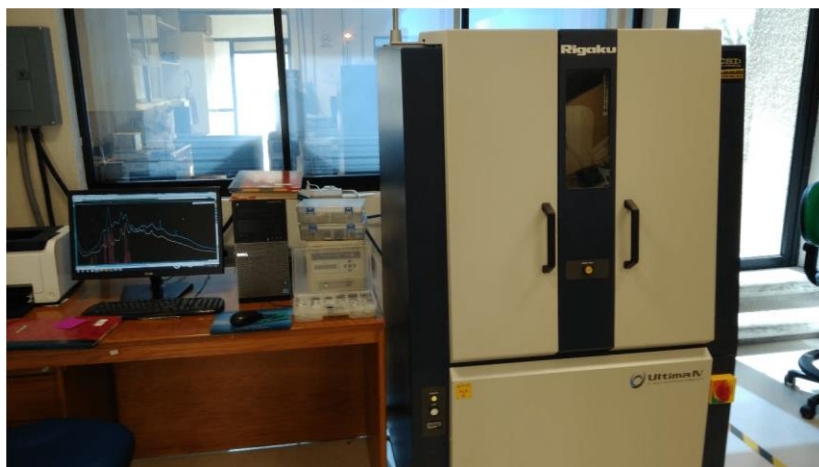


Figura 9.- Fotografía del equipo de Difracción de Rayos X

3.4 CARACTERIZACIÓN POR FTIR

Se utilizó espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier para estudiar los estados vibracionales de muestras comerciales: $\text{CaCO}_3\text{-C}$, CaO-C , $\text{Ca(OH)}_2\text{-C}$, HAp-C; muestras obtenidas de cáscaras de huevo: Raw-E, $\text{CaCO}_3\text{-E}$, CaO-E , $\text{Ca(OH)}_2\text{-E}$ y HAp-E. Los espectros se realizaron en un PerkinElmer Spectrum Two como el de la figura 20, equipado con un accesorio ATR (reflectancia total atenuada) con un cristal de diamante en el rango espectral de $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ y una resolución espectral de 2 cm^{-1} .



Figura 20.- Fotografía del equipo de FTIR

3.5 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA HR-SEM

Se estudió la morfología de $\text{CaCO}_3\text{-E}$, CaO-E , $\text{Ca(OH)}_2\text{-E}$, HAp-E y HAp-C con un microscopio electrónico de barrido Hitachi SU8230 visto en la figura 21. Las muestras se fijaron en un soporte de cobre con cinta de carbón y las condiciones de análisis utilizaron un voltaje de aceleración de electrones de 1 kV a una presión de 12-20 Pa.

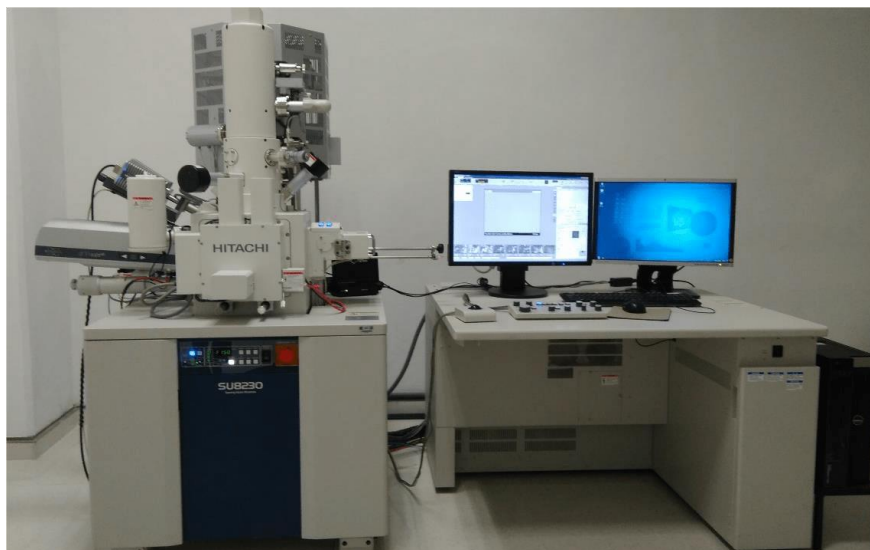


Figura 10.- Fotografía del equipo de HR-SEM

3.6 CONTENIDO MINERAL POR ICP-OES

El contenido mineral de Raw-E, HAp-E y HAp-C se determinó utilizando un espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, modelo Thermo iCAP 6500 Duo View) figura 22 b). Se digirieron 0,1 g de cada muestra con ácido nítrico (Baker 69-70%) en un sistema cerrado por microondas utilizando un Mars Xpress de la marca CEM Figura 22 a), sometándolo a una rampa de calentamiento de temperatura ambiente a 190 °C durante 15 minutos. Las muestras digeridas se excitaron exponiéndolas a un plasma de argón y, al volver al estado fundamental, los elementos se identificaron por sus espectros de emisión característicos. Luego, la intensidad de la emisión se convirtió en concentración elemental comparándola con una curva estándar.

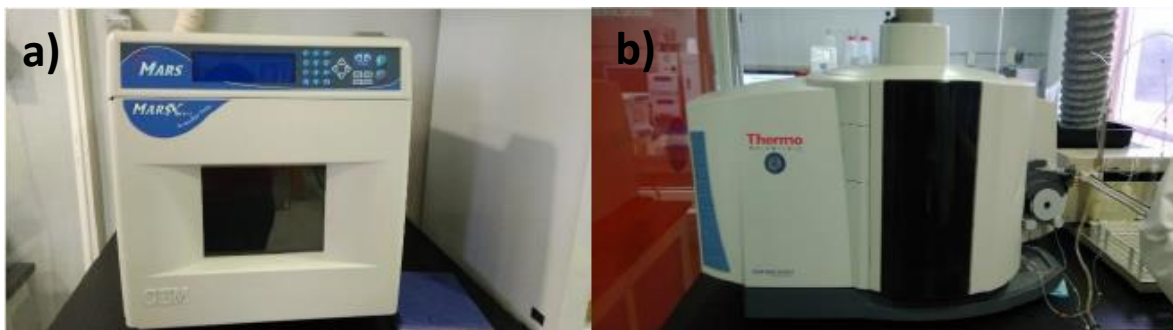


Figura 112.- Fotografías de a) Microondas CEM y b) Equipo de ICP-OES

3.7 TAMAÑO DE PARTÍCULA POR DLS

La distribución del tamaño de partícula de HAp-C y de la hidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo HAp-E se determinó utilizando DLS _Liteizer 500 de Anton Paar. figura 23 con láser rojo de 632,8 nm, ángulo de dispersión de 90 °, temperatura ambiente de 25 ° C y tiempo de paso de 5 s. Se mezclaron 0,02 g de cada muestra con 5 ml de isopropanol y se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. La primera medición se realizó inmediatamente después de la agitación, la segunda 15 min después y la última 30 min después. Esto se hizo para diferenciar la distribución completa del tamaño de partícula.



Figura 23.- Fotografía del equipo de DLS

CAPITULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS TÉRMICO DE LA CÁSCARA DE HUEVO POR TGA/DSC

En la Fig. 24 (a) muestra la curva TG para esta muestra y su segunda derivada para identificar correctamente las regiones de pérdida de masa.

De esta forma, se encontraron cuatro regiones de pérdida de masa y un aumento de masa. El primero (440-485 °C; 6,41%) corresponde a la desnaturalización de proteínas; la segunda pérdida (485-553 °C; 2,27%) se debe a la degradación de la estructura primaria de las proteínas; la tercera pérdida (553-709 °C; 13,43%) está relacionada con la degradación de los carbohidratos. Tanto las proteínas como los carbohidratos provienen de la membrana de la cáscara del huevo [15]. La última pérdida (709-792 °C; 22,60%) corresponde a la transición endotérmica en la que se libera CO₂ del CaCO₃ (Fig. 24 (b)). La ligera ganancia de masa (0,35%) al final de la curva TG se debe a una re-carbonatación de CaO debido al CO₂ disponible en el aire. Con base en estos hallazgos, las cáscaras de huevo se calcinaron a 950 °C (ver recuadro en la Fig. 24 (b)) en condiciones cuasiestáticas durante 3h. Las muestras se etiquetaron de la siguiente manera para su caracterización fisicoquímica: cáscaras de huevo calcinadas a 550 °C (CaCO₃-E), cáscaras de huevo calcinadas a 950 °C (CaO-E) y CaO-E agitado en agua destilada por 24h (Ca(OH)₂-E). Reactivos comerciales de J.T. Baker se utilizó como control: carbonato de calcio (99,9%; CaCO₃-C), óxido de calcio (99,9%; CaO-C) e hidróxido de calcio (96,4%, Ca(OH)₂-C).

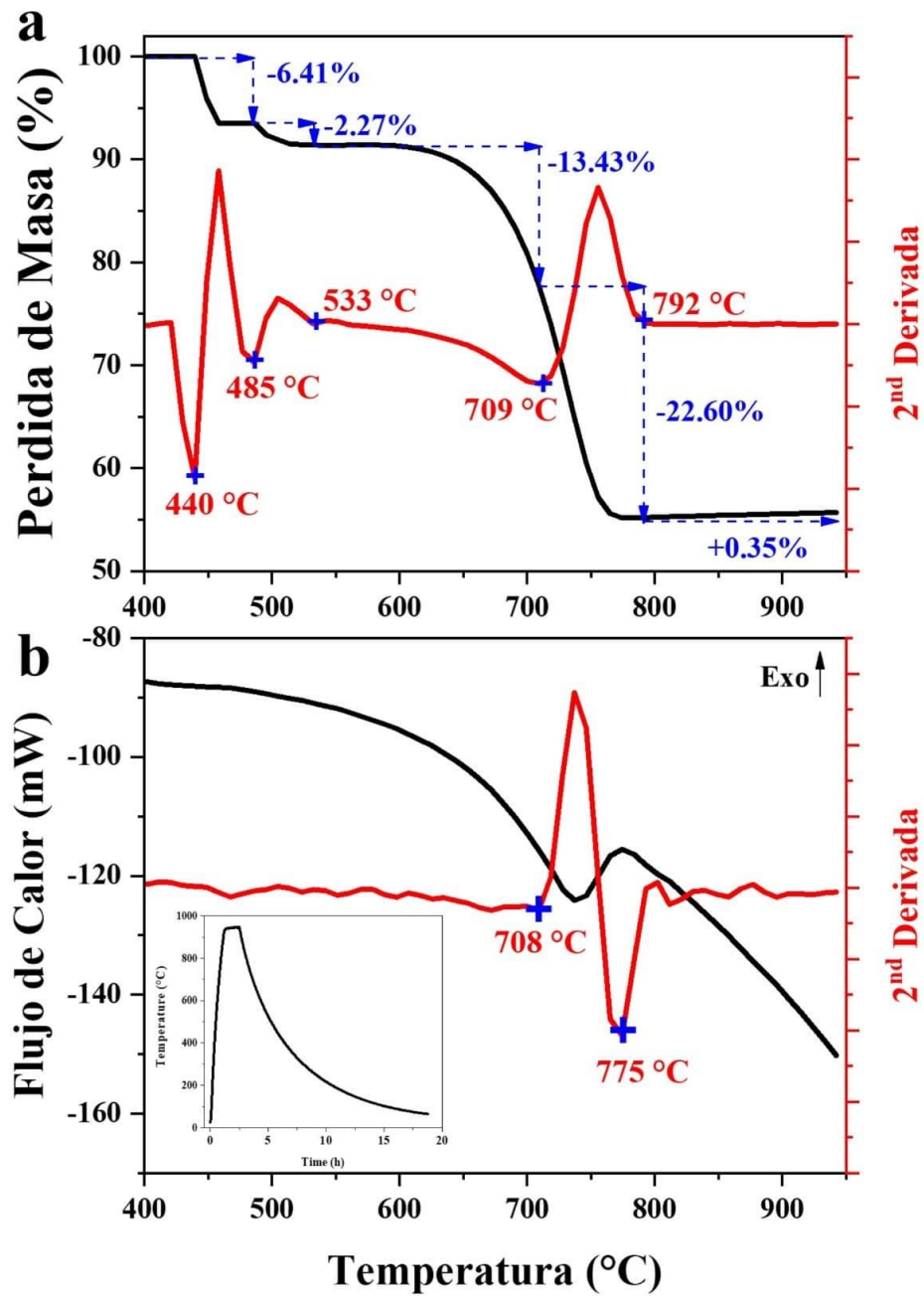


Figura 24.- Termograma de Cáscara de huevo, a) TGA y b) DSC

4.2 ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL CICLO DE LA CAL DE CÁSCARA DE HUEVO Y DE LAS HAPS (HR-SEM)

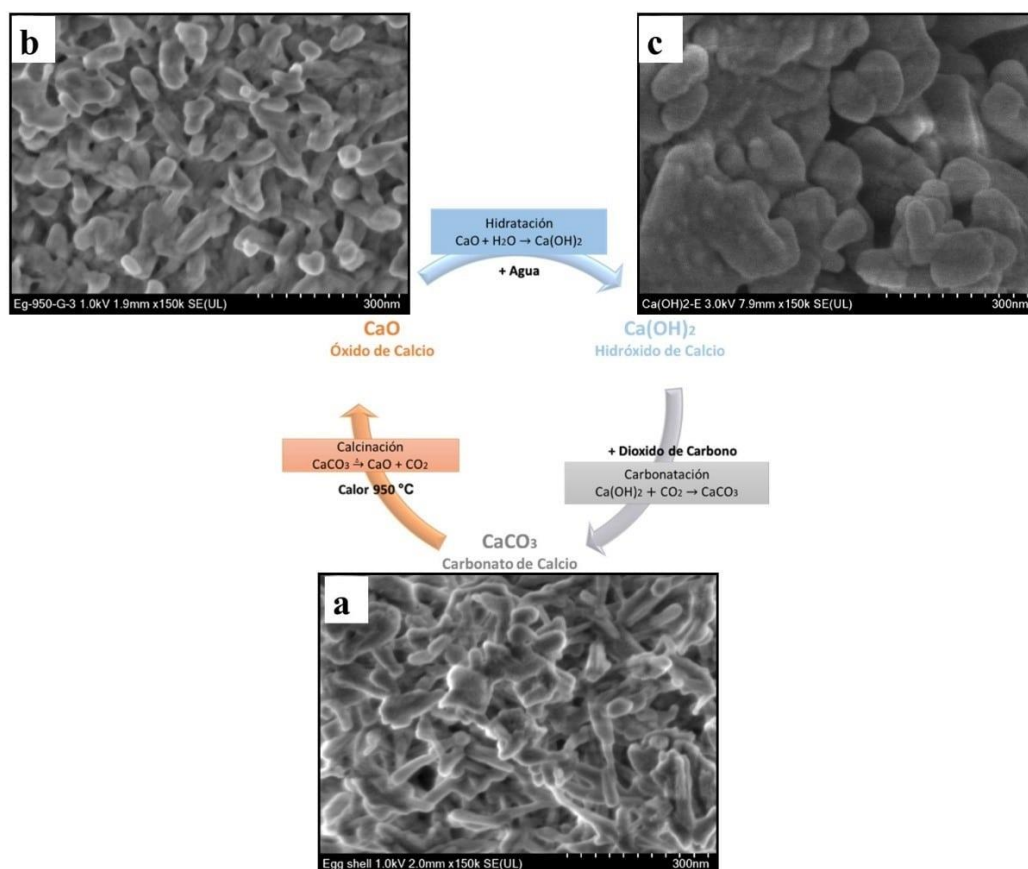
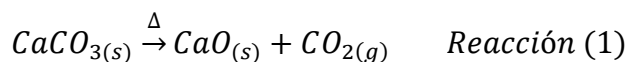


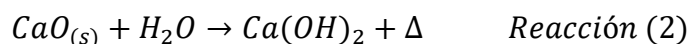
Figura 125.- Ciclo de la Cal a partir de cáscara de huevo

La figura 25 muestra el ciclo de la cal de las cáscaras de huevo de gallina que comienza con CaCO_3 , produciendo CaO después de la calcinación a $950\text{ }^\circ\text{C}$ (ver Reacción (1)). Esta transición endotérmica ocurre entre 709 y $792\text{ }^\circ\text{C}$ (Fig. 24 (a)).

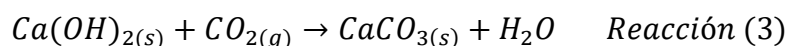


La imagen HR-SEM de CaCO_3 -E (Fig.25 a)) revela que esta muestra está formada por nanocristales alargados que, después de la calcinación a $950\text{ }^\circ\text{C}$ (Fig.25 b)), se convierte en CaO -E pero manteniendo el tamaño (40 - 100 nm de longitud y 40 - 60 nm de espesor) y forma. Se hidrató CaO -E con agua desionizada (relación $1:5$). El agua inició una transición endotérmica que produce Ca(OH)_2 (ver Reacción (2)). La Fig. 25 c) muestra la imagen HR-

SEM de Ca(OH)_2 después de remojar durante dos meses formada por cúmulos de nanocristales (30-100 nm).



Aunque la liberación de energía en esta reacción es abrupta, se requiere más tiempo para una conversión completa. Al final, el sólido casi duplica su volumen. En este trabajo, la Reacción (2) se completó a los dos meses, utilizando un recipiente cerrado para evitar la carbonatación (Reacción (3)) que cerró el ciclo de la cal, volviendo al punto de partida como lo reporta [37].



La figura 26 (a), (c) y (e) muestran las imágenes HR-SEM de HAp-E tomadas a 50000, 100000 y 150000 \times , respectivamente. La Fig. 26 (b), (d) y (f) muestran las imágenes HR-SEM HAp-C (Sigma Aldrich). La principal diferencia entre estos HAp es que HAp-E tiene los iones de las cáscaras de huevo. La HAp-E se calentó a 250 ° C para eliminar los subproductos de la reacción que, según [2], esta temperatura no induce cambios fisicoquímicos en los cristales. En HAp-C, la calcinación hasta 720 ° C podría haberse realizado en función de su distribución de tamaño de cristal. HAp-C presenta morfologías alargadas que forman escamas en un rango de tamaños de cristal de 100 nm a 350 nm de acuerdo con la técnica de diámetro de Feret (Fig. 25 g)).

Comparando el tamaño de cristal de HAp-E con la muestra comercial de Sigma-Aldrich, HAp-C presenta morfologías alargadas formando escamas en un rango de tamaños de cristal de 100 a 350 nm de longitud y 25-50 nm de espesor. La figura 26 g) muestra que las distribuciones del tamaño de los cristales son similares y homogéneas a las reportadas en otros trabajos [51]. La diferencia de forma y tamaño de estas dos muestras reside en la presencia de iones minoritarios provenientes de las cáscaras de huevo y la temperatura de calcinación. Estos iones también podrían afectar otras propiedades fisicoquímicas de la HAp-E, como las estructurales.

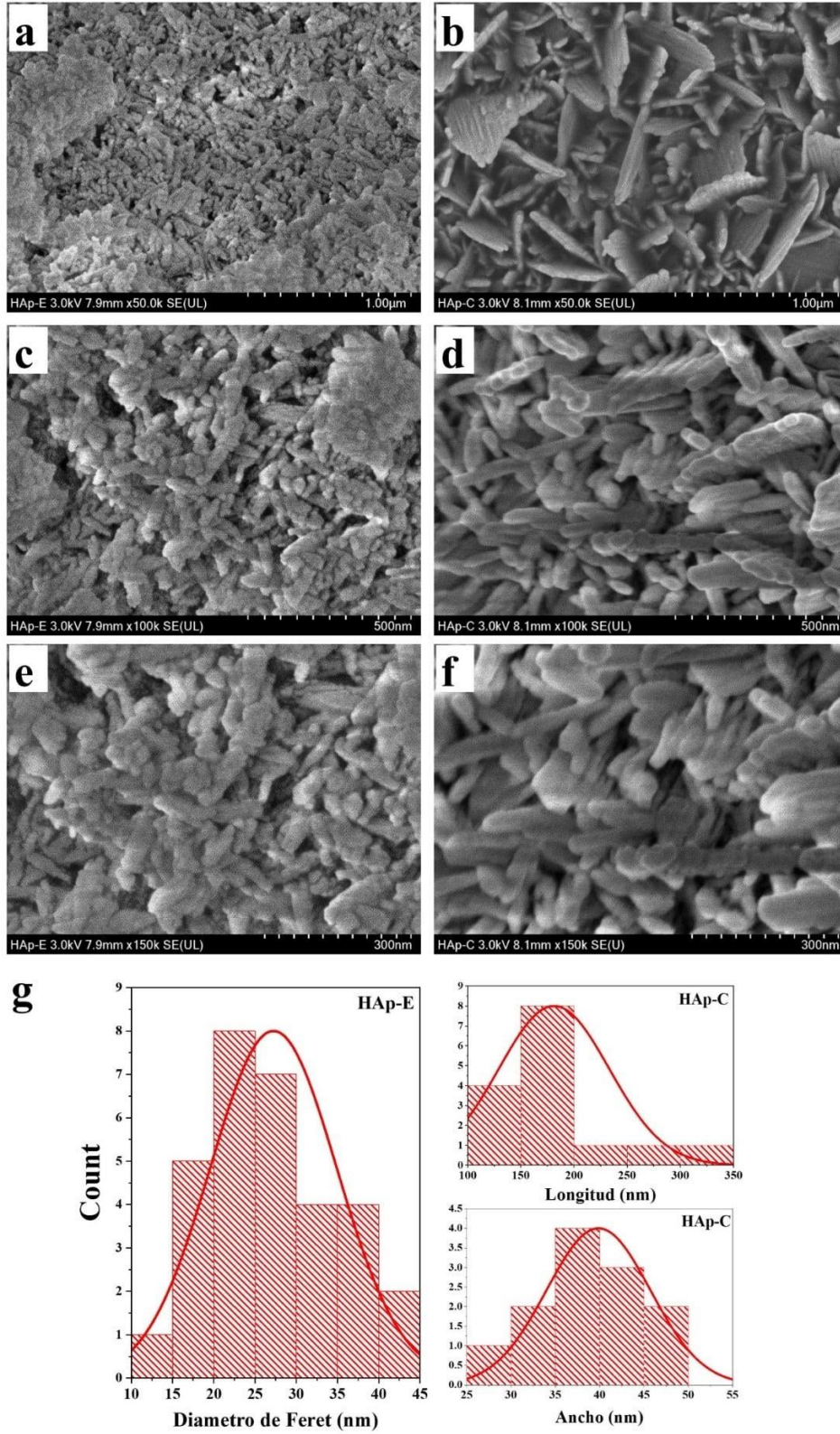


Figura 2136.- Micrografías de HR-SEM a), c) y e) corresponden HAp-E, b), d) y f) HAp-C y g) Diámetro de Feret para HAp-E y HAp-C

4.3 ANÁLISIS CRISTALOGRAFICO DEL CICLO DE LA CAL Y HAPS (DRX)

En la figura 27 a) muestra los patrones de difracción de rayos X de Raw-E, CaCO₃-E y CaCO₃-C indexados como carbonato de calcio (calcita) utilizando la tarjeta ICDD (Centro Internacional de Datos de Difracción) No. 01- 083-0577. Los picos de DRX para Raw-E y CaCO₃-E exhiben un desplazamiento a la derecha con respecto a las posiciones informadas en la tarjeta. Este cambio proviene de la inclusión de iones de sustitución en la red de calcita. El pico debido al plano (104) se ubica a 29.4094 ° en la tarjeta, pero a 29.4795 ° para Raw-E y a 29.4372 ° para CaCO₃-E. El carbonato de calcio comercial no presenta un cambio porque esta muestra no contiene iones adicionales.

La Fig. 27 b) muestra los patrones DRX de CaO-E y CaO-C indexados usando la tarjeta ICDD No. 00-037-1497 (CaO; Cal) y la tarjeta ICDD No. 00-004-0733 (Ca(OH)₂; portlandita). La presencia de portlandita en ambas muestras se debe a la reacción espontánea entre el CaO y el agua presente en la atmósfera del aire. Nuevamente, el CaO-E que proviene de las cáscaras de huevo exhibe un cambio a la derecha relacionado con la inclusión de iones de sustitución. La figura 27 c) muestra patrones DRX de Ca(OH)₂-E y Ca(OH)₂-C (tarjeta ICDD n° 00-004-0733) que también presentan un desplazamiento a la derecha como sucedió con CaO.

En la Fig. 27 d) muestra el FWHM para la muestra comercial y obtenido a partir de cáscaras de huevo, carbonato de calcio, óxido de calcio e hidróxido de calcio. CaCO₃-E, CaCO₃-C, CaO-E, CaO-C y Ca(OH)₂-E exhiben valores cercanos de FWHM entre ellos, mientras que CaCO₃-C tiene el más alto, que se asocia con tiempos de reacción CaO-agua más largos. . Cazalla et al., [52] mostró que el tamaño del cristal de Ca(OH)₂ envejecido durante 1, 4 y 14 años disminuye a medida que aumenta el tiempo de envejecimiento.

La figura 27 e) muestra el tamaño de cristal calculado para todas las muestras aplicando la ecuación de Scherrer a los picos difractados por el plano (104) para CaCO₃, (200) para CaO y (100) para Ca(OH)₂. Según estos cálculos, tanto los reactivos comerciales como los obtenidos de la cáscara de huevo son nanométricos. Sin embargo, algunas diferencias en los valores son evidentes y están relacionadas con la composición química, la ruta de síntesis, el envejecimiento y las temperaturas de calcinación.

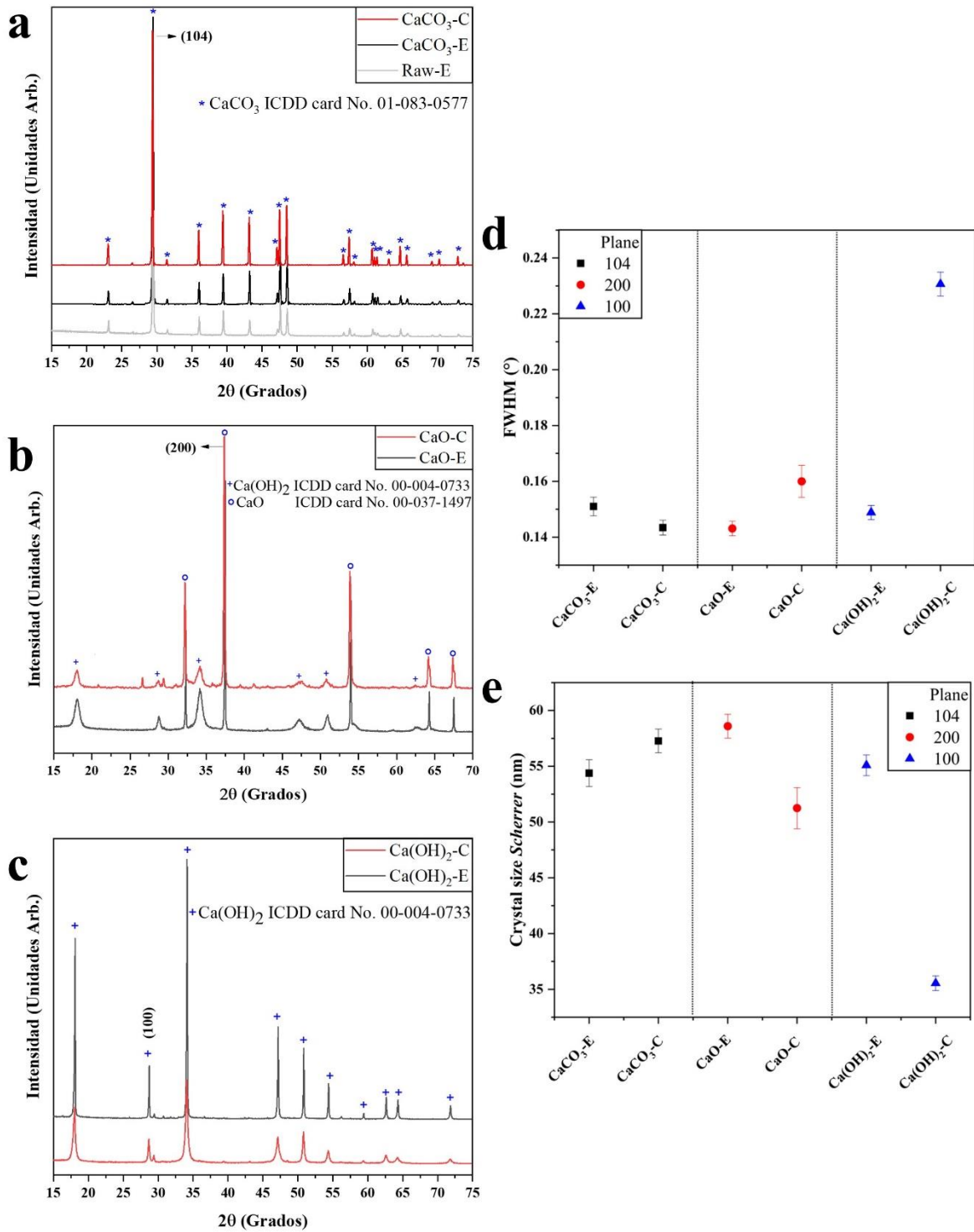


Figura 27.- Patrones de Difracción, a) $\text{CaCO}_3\text{-E}$ y $\text{CaCO}_3\text{-C}$, b) CaO-E y CaO-C , c) $\text{Ca(OH)}_2\text{-E}$ y $\text{Ca(OH)}_2\text{-C}$, d) FWHM del ciclo de cáscara y comercial, e) Tamaño de cristal utilizando la ecuación de Scherrer

En la figura 28 a) se muestran los patrones de rayos X HAp-E y HAp-C indexados con la tarjeta ICDD No. 00-009-0432, siendo la hidroxiapatita la única fase. También se encontró el desplazamiento a la izquierda, como en el caso de las muestras del ciclo de la cal. Lala et al., [53] también encontró un ligero cambio en la posición del pico en el rango de 0.1-0.5 ° que se correlacionó con el tiempo de envejecimiento. Sin embargo, con base en la composición mineral del HAp sintético (Tabla 3), este cambio se debe a la presencia de estos minerales, lo que provoca la contracción de la red de hidroxiapatita. Rivera et al., [10] y Gergely et al. [16] informó que la HAp obtenida de cáscaras de huevo presentaba otras fases como monetita (CaHPO_4) que podrían estar relacionadas con la falta de control del pH durante la síntesis. Cuando se obtiene CaO, es hidratado por el agua ambiental que reacciona con el fosfato tricálcico dando como resultado monetita como impureza. Goloshchapov et al., [54] informaron de la formación de difosfato de calcio (whitlockita) debido a la deshidroxilación de HAp a 900 ° C.

La Fig. 28 b) muestra la FWHM y la determinación del tamaño del cristal utilizando la ecuación de Scherrer para el plano (002), lo que confirma la existencia de nanocristales de hidroxiapatita. La ecuación de Scherrer permite obtener una aproximación del tamaño del cristal presente en las muestras. Sin embargo, es importante considerar que este método fue diseñado para cristales esféricos, y la hidroxiapatita es un material que presenta una estructura hexagonal compacta. Sin embargo, los valores encontrados concuerdan con la distribución del tamaño del cristal determinada por el software ImageJ (ver Fig. 26 g)). Vale la pena señalar que la ecuación de Scherrer da una buena aproximación del tamaño del cristal en cristales nanométricos. Aun así, el análisis de imágenes simultáneo es necesario ya que estas técnicas no detectan la formación de cúmulos. Las diferencias entre la muestra comercial y la hidroxiapatita sintetizada en este trabajo se deben al método de síntesis, la temperatura de calcinación y la presencia de iones minoritarios.

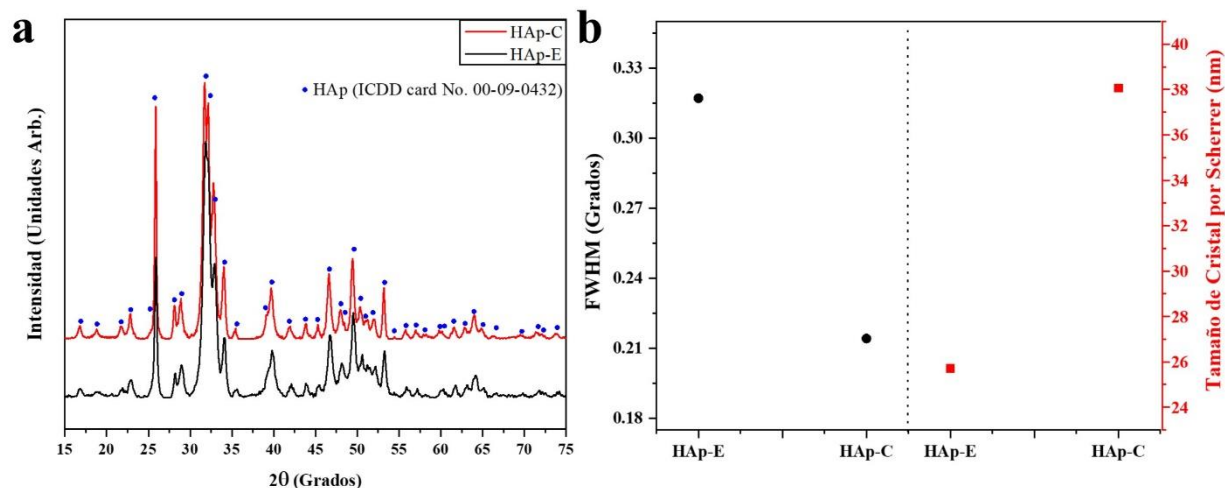


Figura 28.- a) Patrón de difracción de HAp-E y HAp-C y b) FWHM y Tamaño de cristal por Scherrer de HAp-E y HAp-C

4.4 ESTUDIO DE LOS ESTADOS VIBRACIONALES DEL CICLO DE LA CAL Y HAPS POR FTIR

En la figura 29 podemos ver los espectros de IR entre 4000 y 600 cm^{-1} para (a) CaCO_3 -E y CaCO_3 -C, (b) CaO -E y CaO -C, y (c) Ca(OH)_2 -E y Ca(OH)_2 -C. Las letras corresponden a la identificación de banda realizada en este trabajo y se comparan con otras reportadas anteriormente (Tabla 1). Las bandas A_1 (3282 cm^{-1}), C_1 (2361 cm^{-1}), E_1 (1645 cm^{-1}) y F_1 (1396 cm^{-1}) (ver Fig.29 a)) provienen de grupos orgánicos (NH y C=O) de proteínas y carbohidratos de la membrana de la cáscara de huevo cruda.

La banda A_2 (3640 cm^{-1}) corresponde a la absorción de agua ambiental del grupo O-H por CaO . En el caso de las muestras de Ca(OH)_2 , A_3 (3639 cm^{-1}) se debe al enlace hidroxilo del álcali. La banda B_1 (2513 cm^{-1}) se asigna a la presencia del grupo hidroxilo O-H del agua. D_1 (1794 cm^{-1}) corresponde a C=O del ion carbonato (CO_3^{2-}), y la banda B_2 (1468 cm^{-1}) está relacionada con enlaces C-O, también de carbonatos. Tanto el CaO -C como el CaO -E se carbonatan debido al CO_2 ambiental a niveles bajos que la difracción de rayos X no pudo detectar (ver Fig. 27).

Las figuras 29 b) y c) muestran los valores C_2 (1411 cm^{-1}), B_3 (1412 cm^{-1}), E_2 (1054 cm^{-1}), D_3 (1056 cm^{-1}) e I_1 (847 cm^{-1}) 1) bandas asignadas a enlaces CO de carbonatos. Finalmente, las bandas H_1 , F_2 y E_3 ubicadas alrededor de 870 cm^{-1} pertenecen al enlace Ca-O. La banda

J_1 (711 cm^{-1}) corresponde a enlaces C-O asociados con deformaciones fuera del plano debido a la existencia de carbonato de calcio. El hecho de que HAp-E esté carbonatada no es un problema, ya que las hidroxiapatitas de mamíferos también están carbonatadas.

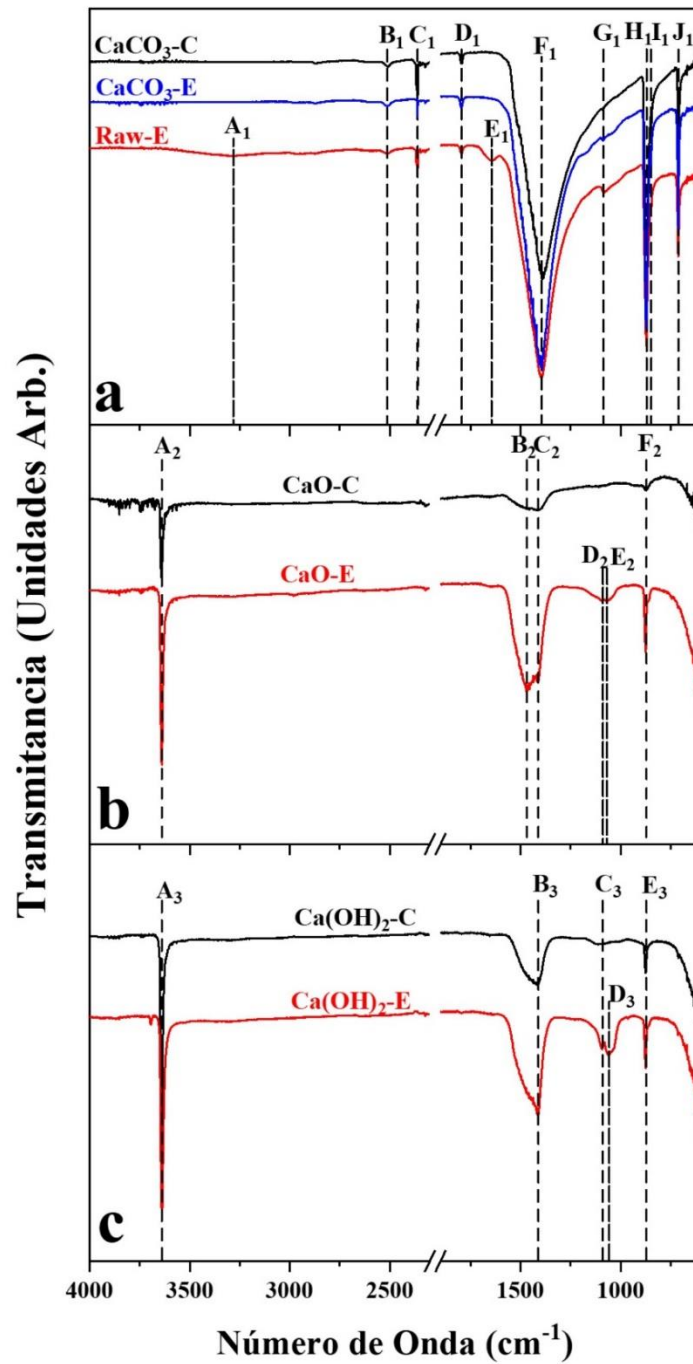


Figura 29.- Espectro FTIR de a) $\text{CaCO}_3\text{-E}$ y $\text{CaCO}_3\text{-C}$, b) CaO-E y CaO-C y c) $\text{Ca(OH)}_2\text{-E}$ y $\text{Ca(OH)}_2\text{-C}$

FT-IR			
Grupo Funcional	Número de Onda(cm ⁻¹)*	Número de Onda (cm ⁻¹)	Referencias
v (O-H)	(A ₂) 3640	3643	[55]
	(A ₃) 3639	3620	[56]
Amidas & Aminas	(A ₁) 3282	3288	[56,57]
v (O-H)	(B ₁) 2513	2516	[58]
N-H (Amidas & Aminas)	(C ₁) 2361	2360	[57]
v (C=O)	(D ₁) 1794	1799	[56-58]
		1798	[59]
		1795	[55]
C=O (Amidas & Aminas)	(E ₁) 1645	1652	[56,57]
		1645	[58]
v (C-O)	(B ₂) 1468	1459	[59]
	(C ₂) 1411	1417	[55,56]
	(B ₃) 1412		
Amidas & Aminas	(F ₁) 1396	1385	[56,57]
v _s (C-O)	(G ₁) 1086	1083	[58]
	(D ₂) 1088		
	(C ₃) 1091		
C-O	(E ₂) 1054	1064	[60]
	(D ₃) 1056		
ω (Ca-O)	(H ₁) 870	877, 875, 866	[55]
	(F ₂) 872	875	[56,57]
	(E ₃) 873	874	[59]
C-O	(I ₁) 847	863	[60]
δ (C-O)	(J ₁) 711	713	[55,56,59]
		712	[57,58]

* = Este trabajo. v = stretching, δ = bending, ω = wagging.
as= asimétrico, s= simétrico.

Tabla 1.- Posiciones de las bandas FTIR de las muestras de cáscara de huevo y muestras comerciales de CaCO₃, CaO y Ca(OH)₂

La Fig. 30 muestra los espectros de IR (4000-600 cm⁻¹) para HAp-E y HAp-C. Las letras corresponden a la identificación realizada en este trabajo en comparación con otros reportados en la literatura (Tabla 2). Una banda (3571 cm⁻¹) corresponde al grupo carboxilo (-COOH) asociado a la hidroxiapatita debido a la interacción de los grupos O-H con el carbonato CO₃²⁻. La banda B (1639 cm⁻¹) se debe al grupo hidroxilo (O-H) debido al agua absorbida por la muestra. Las bandas C (1452 cm⁻¹), D (1414 cm⁻¹) y H (877 cm⁻¹) están asociadas con grupos carbonato (CO₃²⁻) debido al proceso de carbonatación durante la síntesis de hidroxiapatita, ya que no tienen una atmósfera controlada. Mientras tanto, las

bandas E (1091 cm^{-1}), F (1023 cm^{-1}) y G (962 cm^{-1}) pertenecen a los grupos fosfato (PO_4^{3-}) en ambas hidroxiapatitas.

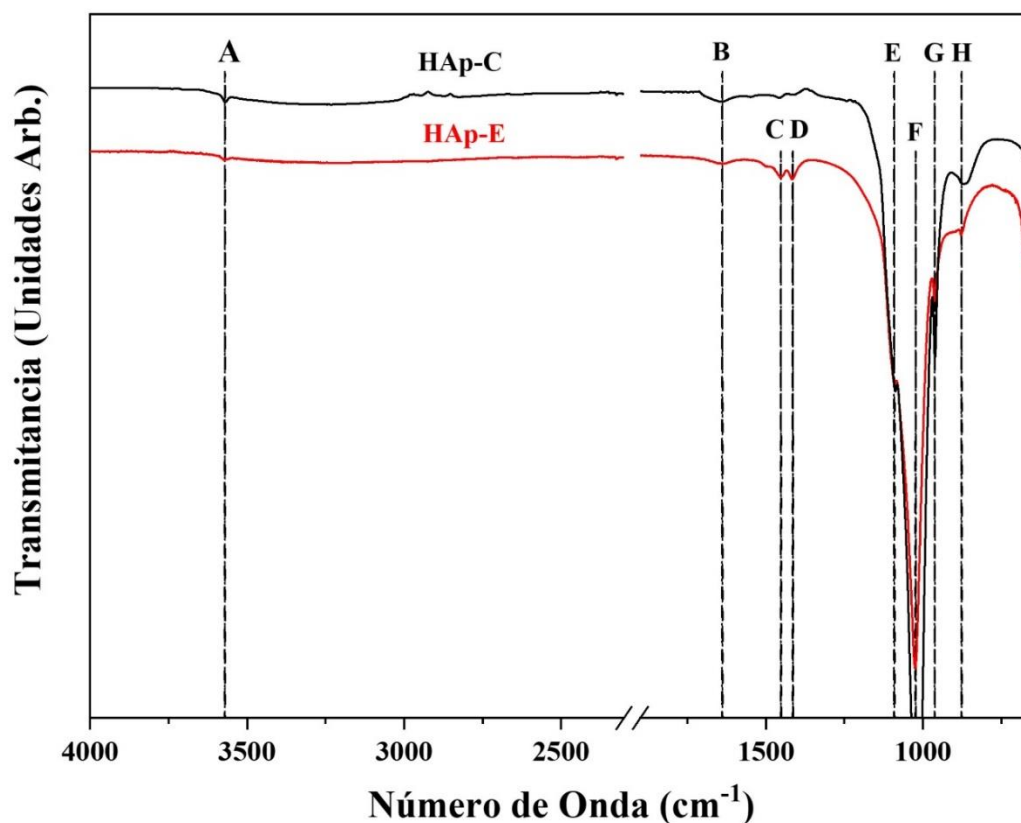


Figura 30.- Espectro FTIR de HAp-E y HAp-C

FT-IR (HAps)			
Grupo Funcional	Número de Onda (cm^{-1})*	Número de Onda (cm^{-1})	Referencias
ν (COOH)	(A) 3571	3570	[61]
δ (O-H)	(B) 1639	1642	[62]
ν_{3as} (CO_3^{2-})	(C) 1452	1454, 1412	[62,63]
	(D) 1414	1416	[63]
ν_{3as} (PO_4^{3-})	(E) 1091	1088, 1014	[62,63]
	(F) 1023	1023	[63]
ν_{1s} (PO_4^{3-})	(G) 962	962	[63]
		960	[62,63]
ν_{2as} (CO_3^{2-})	(H) 877	873	[63]
		872	[62,63]

* = Este trabajo. ν = stretching, δ = bending.
as= asimétrico, s= simétrico.

Tabla 2.- Posición de las bandas de FTIR de HAps

4.5 ANÁLISIS DE CONTENIDO MINERAL A PARTIR DE ICP-OES

En la Tabla 3 muestra el contenido mineral de Raw-E, HAp-E y HAp-C, así como de hidroxiapatitas de humanos (HAp-H), bovinos (HAp-B) y porcinos (HAp-P) reportados en otros lugares [2]. HAp-E exhibe valores de contenido de minerales más altos que Raw-E como efecto de concentración después de eliminar los orgánicos de las cáscaras de huevo, como se muestra en el análisis TGA de cáscaras de huevo. Vale la pena señalar que HAp-E contiene cantidades similares de minerales que las hidroxiapatitas humanas, bovinas y porcinas. Lo que es más importante, el nivel de contenido de estos iones se acerca a los valores informados para las hidroxiapatitas de mamíferos. Los iones en la cáscara de huevo podrían ayudar a la HAp en diferentes funciones en la osteoconductividad y osteointegración de la regeneración ósea.

Por ejemplo, el magnesio es uno de los iones más importantes en estas actividades debido a que este ión ayuda a la formación ósea al inducir la proliferación, diferenciación, actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) y deposición de minerales en las células osteoblásticas, y disminuir la diferenciación y actividad de los osteoclastos [64] y una disminución de los niveles de Mg resulta en enfermedades como la osteoporosis [65]. Otro ion con mayor presencia en los huesos de mamíferos es el sodio, este ion es importante en los procesos de osteoactividad por su mayor presencia en el líquido extracelular (ECF) que baña el sitio de formación del hueso durante su mineralización [66]. El estroncio es otro ion que por su similitud con el ion de Ca juega un papel importante en la regeneración ósea por su participación en la diferenciación de las células madre mesenquimales (MSC) regulando la expresión de genes marcadores de osteoblastos, como Runx2, OCN, osteopontina (OPN), sialoproteína ósea (BSP) y colágeno tipo 1, y el aumento de la actividad de la ALP y la mineralización de la matriz. [67]. Iones como Zn y Cu son importantes para las actividades enzimáticas, así como promotores de la angiogénesis regulada positivamente por VEGF y estimulan la proliferación de células endoteliales [68], [69].

Además, HAp-E cumple con la norma ASTM International F1088-04a [70] ya que no hay presencia de Hg, As y Cd en HAp-E, y solo se encontró 1 ppm de Pb (máximo 30 ppm). La hidroxiapatita sintética comercial (HAp-C) solo contiene Ca y P, como se esperaba. La presencia de Al y Zn podría provenir de los rastros minerales que tienen los reactivos.

La relación atómica Ca/P para HAp-H, HAp-B, HAp-P, HAp-E y HAp-C se calculó e incluyó en la parte inferior de la Tabla 3. La hidroxiapatita estequiométrica pura tiene una relación atómica Ca/P de 1,67 (Ca: 39,89%; O: 41,41%; H: 0,20%; P: 18,50%). HAp-H y HAp-C de Sigma Aldrich exhiben una relación Ca/P más alta que el valor teórico. HAp-H presenta deficiencia tanto de Ca como de P relacionada con su proceso de síntesis en el cuerpo humano y la reserva mineral. Además, los huesos humanos siempre presentan valores bajos de Ca y P después del pico de densidad mineral (34-36 años) [18]. En HAp-C, la relación Ca/P superior a 1,67 se debe al proceso de síntesis en el que la hidroxiapatita es rica en Ca⁺² pero deficiente en P⁺⁵. HAp-B, HAp-P y HAp-E presentan bajas relaciones Ca/P también relacionadas con sus bajos niveles de Ca y P debido a trazas minerales en sitios de sustitución en la red de HAp.

Mineral (ppm)	Raw-E	* HAp-H	* HAp-B	* HAp-P	HAp-E	HAp-C
Ca	428404	285898	217222	216983	304417	425142
Mg	4436	3887	4156	4184	3621	ND
P	1405	107267	120648	161878	157998	125240
Na	990	7912	4708	4345	312	ND
S	788	26	665	685	252	ND
Sr	240	90	ND	134	127	ND
K	267	56	127	240	316	ND
Si	34	120	21	331	125	ND
Fe	17	89.2	ND	17	15	12
Al	17	37	ND	16	28	6
Zn	ND	179	83	185	124	4
Ba	28.63	NR	NR	NR	16	ND
Cu	ND	NR	NR	NR	12	ND
Mn	ND	NR	NR	NR	1	ND
Ni	ND	NR	NR	NR	39	ND
Tl	ND	NR	NR	NR	19	ND
Pb	ND	NR	NR	NR	1	ND
Ca/P	-	2.06	1.39	1.04	1.49	2.62

* Londoño-Restrepo et al. [2], ND: No detectado, NR: No reportado.

Tabla 3.- Contenido mineral de cáscaras de huevo (Raw-E), HAp de huesos humanos (HAp-H), HAp de huesos bovinos (HAp-B), HAp de huesos porcinos (HAp-P), HAp sintetizada a partir de cáscaras de huevo (HAp-E) y Sigma Aldrich HAp (HAp-C).

4.6 ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE PARTÍCULA POR DLS

La figura 31 muestra la distribución del tamaño de partícula para las hidroxiapatitas sintéticas antes del envejecimiento: HAp-C y HAp-E. Ambas muestras exhiben baja polidispersidad y distribución de tamaño monomodal de micropartículas. La Fig. 30 a) muestra que la mayor parte de la población de tamaño de partícula de HAp-E está entre 800 y 3700 nm (0,8-3,7 μm) con picos máximos alrededor de 1750 nm (1,75 μm). La población más grande de HAp-C está entre 1700 y 6500 nm (1,7 a 6,5 μm), con picos máximos alrededor de 2457 nm (2,4 μm) (Fig. 30 b)). Este rango es micrométrico ya que los cristales han formado cúmulos de cristales nanométricos lo que se puede correlacionar con los resultados del tamaño de cristal calculado por Scherrer Figura 28 b) y con las micrografías obtenidas por HR-SEM figura 26 que es después del envejecimiento.

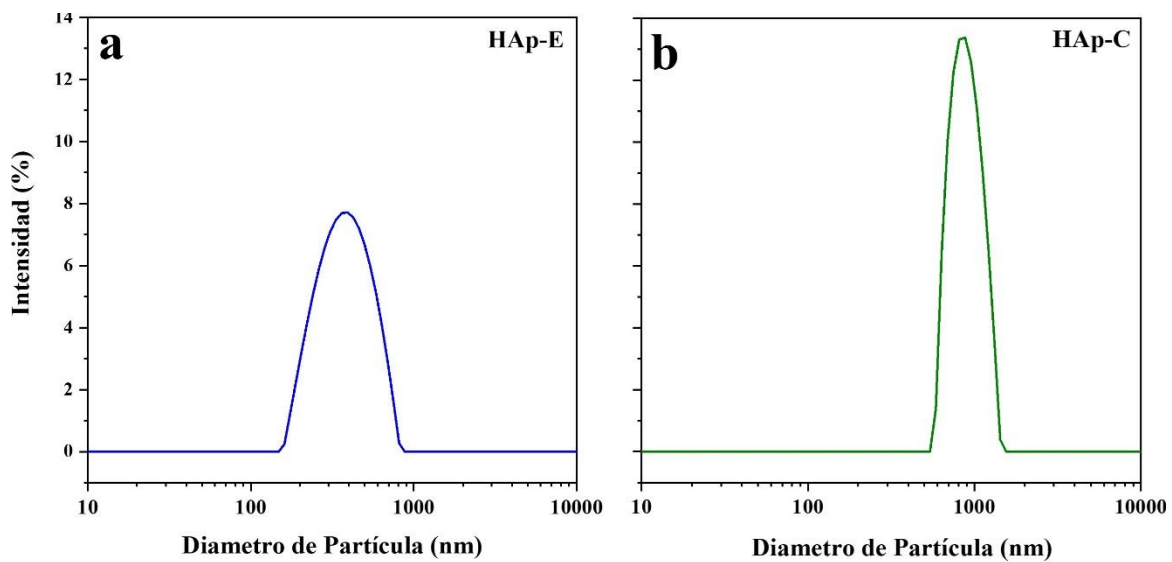


Figura 31.- Distribución del tamaño de partícula por DLS

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA

- Las cáscaras de huevo se pueden utilizar como fuente natural para obtener Ca(OH)_2 nanométrico a lo largo del ciclo de la cal.
- Las cáscaras de huevo proporcionaron los minerales minoritarios, como Mg^{+2} , K^{+1} , Na^{+2} , Zn^{+2} , entre otros, en niveles cercanos a los reportados para las hidroxiapatitas de huesos humanos, bovinos y porcinos.
- Los métodos convencionales de síntesis no consideran su inclusión; por tanto, la muestra comercial no los contenía en comparación con la HAp sintetizada a partir de la cáscara de huevo.
- El tamaño nanométrico de los cristales sintetizados fue corroborado por difracción de rayos X y procesamiento de imágenes HR-SEM.
- La HAp-E obtenida (10-45 nm) tiene un tamaño de cristal más pequeño que la muestra comercial (100-350 nm), cuyos cristales forman grupos de escamas micrométricas, como se ve en las imágenes HR-SEM.
- Este hecho es importante ya que se ha demostrado que los nanocristales favorecen la regeneración ósea debido a su mayor superficie. Significa que el HAp-E tiene el potencial de usarse en la regeneración ósea guiada.
- El Ca(OH)_2 obtenido a partir de cáscaras de huevo es un precursor adecuado para sintetizar hidroxiapatita carbonatada nanométrica que contiene los mismos iones minoritarios que las hidroxiapatitas de mamíferos.
- Usando la técnica de DLS se pudo analizar la distribución de tamaño de partícula de la Hidroxiapatita obtenida por cáscara de huevo, que está formada por aglomerados de cristales nanométricos.
- A partir de los resultados obtenidos se prevé que la hidroxiapatita obtenida a partir de cáscara de huevo tenga una mejor respuesta en cuanto bioactividad debido a los iones presentes en su estructura, a partir de esto se harán pruebas de bioactividad en fluido biológico simulado para poder evaluar estas características que obtiene la HAp.

REFERENCIAS

- [1] E. O'Neill, G. Awale, L. Daneshmandi, O. Umerah, and K. W. H. Lo, "The roles of ions on bone regeneration," *Drug Discov. Today*, vol. 23, no. 4, pp. 879–890, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.drudis.2018.01.049.
- [2] S. M. Londoño-Restrepo, R. Jeronimo-Cruz, B. M. Millán-Malo, E. M. Rivera-Muñoz, and M. E. Rodríguez-García, "Effect of the Nano Crystal Size on the X-ray Diffraction Patterns of Biogenic Hydroxyapatite from Human, Bovine, and Porcine Bones," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-42269-9.
- [3] S. M. Londoño-Restrepo, R. Jeronimo-Cruz, E. Rubio-Rosas, and M. E. Rodríguez-García, "The effect of cyclic heat treatment on the physicochemical properties of bio hydroxyapatite from bovine bone," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 29, no. 5, May 2018, doi: 10.1007/s10856-018-6061-5.
- [4] N. A. M. Barakat, M. S. Khil, A. M. Omran, F. A. Sheikh, and H. Y. Kim, "Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods," *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 209, no. 7, pp. 3408–3415, 2009, doi: 10.1016/j.jmatprotec.2008.07.040.
- [5] C. F. Ramirez-Gutierrez, A. F. Palechor-Ocampo, S. M. Londoño-Restrepo, B. M. Millán-Malo, and M. E. Rodríguez-García, "Cooling rate effects on thermal, structural, and microstructural properties of bio-hydroxyapatite obtained from bovine bone," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 104, no. 2, pp. 339–344, Feb. 2016, doi: 10.1002/jbm.b.33401.
- [6] A. M. Janus, M. Faryna, K. Haberko, A. Rakowska, and T. Panz, "Chemical and microstructural characterization of natural hydroxyapatite derived from pig bones," in *Microchimica Acta*, Jun. 2008, vol. 161, no. 3–4, pp. 349–353, doi: 10.1007/s00604-007-0864-2.
- [7] K. Haberko, M. M. Bućko, W. Mozgawa, A. Pyda, J. Brzezińska-Miecznik, and J. Carpentier, "Behaviour of bone origin hydroxyapatite at elevated temperatures and in O₂ and CO₂ atmospheres," *Ceram. Int.*, vol. 35, no. 6, pp. 2537–2540, 2009, doi: 10.1016/j.ceramint.2009.02.008.
- [8] S. M. Londoño-Restrepo, B. M. Millán-Malo, A. del Real-López, and M. E. Rodríguez-García, "In situ study of hydroxyapatite from cattle during a controlled calcination process using HT-XRD," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 105, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.110020.
- [9] S. C. Wu, H. C. Hsu, S. K. Hsu, Y. C. Chang, and W. F. Ho, "Synthesis of hydroxyapatite from eggshell powders through ball milling and heat treatment," *J.*

- Asian Ceram. Soc.*, vol. 4, no. 1, pp. 85–90, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.jascer.2015.12.002.
- [10] E. M. Rivera *et al.*, “Synthesis of hydroxyapatite from eggshells,” *Mater. Lett.*, vol. 41, no. 3, pp. 128–134, 1999, doi: 10.1016/S0167-577X(99)00118-4.
- [11] S. S. A. Abidi and Q. Murtaza, “Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction,” *J. Mater. Sci. Technol.*, vol. 30, no. 4, pp. 307–310, 2014, doi: 10.1016/j.jmst.2013.10.011.
- [12] P. Wang, C. Li, H. Gong, H. Wang, and J. Liu, “Morphology control and growth mechanism of magnesium hydroxide nanoparticles via a simple wet precipitation method,” *Ceram. Int.*, vol. 37, no. 8, pp. 3365–3370, 2011, doi: 10.1016/j.ceramint.2011.05.138.
- [13] A. Szcześ, L. Hołysz, and E. Chibowski, “Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 249, pp. 321–330, 2017, doi: 10.1016/j.cis.2017.04.007.
- [14] M. T. Hincke, Y. Nys, J. Gautron, K. Mann, A. B. Rodriguez-Navarro, and M. D. McKee, “The eggshell: Structure, composition and mineralization,” *Front. Biosci.*, vol. 17, no. 4, pp. 1266–1280, 2012, doi: 10.2741/3985.
- [15] Y. Nys, J. Gautron, J. M. Garcia-Ruiz, and M. T. Hincke, “Avian eggshell mineralization: Biochemical and functional characterization of matrix proteins,” *Comptes Rendus - Palevol*, vol. 3, no. 6-7 SPEC.ISS., pp. 549–562, 2004, doi: 10.1016/j.crpv.2004.08.002.
- [16] G. Gergely *et al.*, “Preparation and characterization of hydroxyapatite from eggshell,” *Ceram. Int.*, vol. 36, no. 2, pp. 803–806, 2010, doi: 10.1016/j.ceramint.2009.09.020.
- [17] R. Lugo *et al.*, “Wet chemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite flakes : effect of pH and sintering temperature on structural and morphological properties,” *R. Soc. open Sci.*, vol. 5, no. 180962, pp. 1–14, 2018.
- [18] A. R. Ibrahim *et al.*, “Synthesis of rod-like hydroxyapatite with high surface area and pore volume from eggshells for effective adsorption of aqueous Pb(II),” *Mater. Res. Bull.*, vol. 62, pp. 132–141, 2015, doi: 10.1016/j.materresbull.2014.11.023.
- [19] M. Sadat-Shojai, M. T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, and A. Jamshidi, “Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures,” *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 8, pp. 7591–7621, 2013, doi: 10.1016/j.actbio.2013.04.012.
- [20] S. M. Londoño-Restrepo, C. F. Ramirez-Gutierrez, H. Villarraga-Gómez, and M. E. Rodriguez-García, Study of microstructural, structural, mechanical, and vibrational properties of defatted trabecular bovine bones: natural sponges. 2019.

- [21] A. L. Giraldo-Betancur et al., “Comparison of physicochemical properties of bio and commercial hydroxyapatite,” *Curr. Appl. Phys.*, vol. 13, no. 7, pp. 1383–1390, 2013, doi: 10.1016/j.cap.2013.04.019.
- [22] S. Rujitanapanich, P. Kumpapan, and P. Wanjanoi, “Synthesis of hydroxyapatite from oyster shell via precipitation,” *Energy Procedia*, vol. 56, no. C, pp. 112–117, 2014, doi: 10.1016/j.egypro.2014.07.138.
- [23] B.A. Correa-Piña, O.M. Gomez-Vazquez, S.M. Londoño-Restrepo, L.F. Zubieta-Otero, B.M. Millan-Malo, M.E. Rodriguez-Garcia, “Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite added with magnesium obtained by wet chemical precipitation,” *Prog. Nat. Sci.*, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2021.06.006>.
- [24] S. M. Londoño-Restrepo, C. F. Ramirez-Gutierrez, A. del Real, E. Rubio-Rosas, and M. E. Rodriguez-García, “Study of bovine hydroxyapatite obtained by calcination at low heating rates and cooled in furnace air,” *J. Mater. Sci.*, vol. 51, no. 9, pp. 4431–4441, 2016, doi: 10.1007/s10853-016-9755-4.
- [25] I. S. Kim and P. N. Kumta, “Sol-gel synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite powder,” *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.*, vol. 111, no. 2–3, pp. 232–236, 2004, doi: 10.1016/j.mseb.2004.04.011.
- [26] M. Andrés-Vergés, C. Fernández-González. M. Martínez-Gallego “Hydrothermal Synthesis of Calcium Deficient Hydroxyapatites with Controlled Size and Homogeneous Morphology,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 2219, no. 98, pp. 1245–1250, 1998, [https://doi.org/10.1016/S0955-2219\(98\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S0955-2219(98)00049-1).
- [27] S. A. Manafi and S. Jougehhdoust, “Synthesis of Hydroxyapatite Nanostructure by Hydrothermal Condition for Biomedical Application,” *Iran. J. Pharm. Sci.*, vol. 5, no. 2, pp. 89–94, Apr. 2009, http://www.ijps.ir/article_2075.html.
- [28] N. A. S. Mohd Pu’ad, R. H. Abdul Haq, H. Mohd Noh, H. Z. Abdullah, M. I. Idris, and T. C. Lee, “Synthesis method of hydroxyapatite: A review,” in *Materials Today: Proceedings*, Jan. 2019, vol. 29, pp. 233–239, doi: 10.1016/j.matpr.2020.05.536.
- [29] A. Yelten and S. Yilmaz, “ScienceDirect Various Parameters Affecting the Synthesis of the Hydroxyapatite Powders by the Wet Chemical Precipitation Technique,” *Mater. Today Proc.*, vol. 3, no. 9, pp. 2869–2876, 2016, doi: 10.1016/j.matpr.2016.07.006.
- [30] S. C. Cox, Richard I. Walton, “Comparison of techniques for the synthesis of hydroxyapatite,” in *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials*, vol. 4, 2014, pp. 37–47.
- [31] T. K. Achar, A. Bose, and P. Mal, “Mechanochemical synthesis of small organic molecules,” *J. Org. Chemistry*, vol. 13, pp. 1907–1931, 2017, doi: 10.3762/bjoc.13.186.

- [32] T. D. Shen, C. C. Koch, T. L. McCormick, and R. J. Nemanich, "The structure and property characteristics of amorphous / nanocrystalline silicon produced by ball milling," *J. Mater. Res. Soc.*, vol. 10, no. 1, pp. 139–148, 1995, doi: <https://doi.org/10.1557/JMR.1995.0139>.
- [33] J. Niepce, C. Gras, E. Ga, and L. Cae, "Some recent developments in mechanical activation and mechanosynthesis†'," *J. Mater. Chemistry*, vol. 9, pp. 305–314, 1999, doi: 10.1039/A804645J.
- [34] K. C. B. Yeong, J. Wang, and S. C. Ng, "Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from CaO and CaHPO," *Biomaterials*, vol. 22, pp. 2705–2712, 2001, doi: 10.1016/s0142-9612(00)00257-x.
- [35] M. H. Fathi and E. M. Zahrani, "Fabrication and characterization of fluoridated hydroxyapatite nanopowders via mechanical alloying," *J. Alloys Compd.*, vol. 475, pp. 408–414, 2009, doi: 10.1016/j.jallcom.2008.07.058.
- [36] J. Carvalho, J. Araujo, and F. Castro, "Alternative low-cost adsorbent for water and wastewater decontamination derived from eggshell waste: An overview," *Waste and Biomass Valorization*, vol. 2, no. 2. Springer, pp. 157–167, May 07, 2011, doi: 10.1007/s12649-010-9058-y.
- [37] M. Galván-Ruiz, J. Hernández, L. Baños, J. Noriega-Montes, and M. E. Rodríguez-García, "Characterization of Calcium Carbonate, Calcium Oxide, and Calcium Hydroxide as Starting Point to the Improvement of Lime for Their Use in Construction," *J. Mater. Civ. Eng.*, vol. 21, no. 11, pp. 694–698, Nov. 2009, doi: 10.1061/(asce)0899-1561(2009)21:11(694).
- [38] C. De Blasio, *Fundamentals of Biofuels Engineering and Technology*. 2019.
- [39] B. D. CULLITY, *X-Ray Diffraction Addison-Wesley Metallurgy Series*, vol. 53. 1956.
- [40] C. Hammond, *The Basics in Crystallography and Diffraction*. 2009.
- [41] B. Stuard, *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. 1997.
- [42] M. A. Mohamed, J. Jaafar, A. F. Ismail, M. H. D. Othman, and M. A. Rahman, "Spectroscopy," in *Membrane Characterization*, Elsevier B.V., 2017, pp. 3–29.
- [43] M. Omid et al., "7. Characterization of biomaterials," in *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering*, no. September 2018, Elsevier Ltd, 2017, pp. 97–116.
- [44] W. Zhou, R. Apkarian, Z. L. Wang, D. Joy, *Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM)*. 2006.
- [45] O. Wells, *Scanning Electron Microscopy*. 1974

- [46] A. Ul-hamid, *A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy*. 2018.
- [47] R. Pecora, "Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 2, pp. 123–131, 2000.
- [48] M. Kaszuba and U. N. Mcknight, David, Malcolm T Connah , Fraser K. McNeil-watson, "Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 10, pp. 823–829, 2008, doi: 10.1007/s11051-007-9317-4.
- [49] R. C. Choudhary, S. Kumari, R. V Kumaraswamy, and A. Pal, "Characterization Methods for Chitosan- - Based Nanomaterials," in *Plant Nanobionics, Nanotechnology in the Life Sciences*, 2019, pp. 103–116.
- [50] S. Ghosh, V. L. Prasanna, B. Sowjanya, P. Srivani, and M. Alagaraja, "Inductively coupled plasma - Optical emission spectroscopy : A review.," *Asian J. Pharma Anal.*, vol. 3, no. 1, pp. 24–33, 2013.
- [51] W. Luo et al., "The effect of disaggregated nano-hydroxyapatite on oral biofilm in vitro," *Dent. Mater.*, vol. 36, no. 7, pp. 207–216, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.dental.2020.04.005.
- [52] O. Cazalla, C. Rodriguez-Navarro, E. Sebastian, G. Cultrone, and M. J. De la Torre, "Aging of lime putty: Effects on traditional lime mortar carbonation," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 83, no. 5, pp. 1070–1076, 2000, doi: 10.1111/j.1151-2916.2000.tb01332.x.
- [53] S.D. Lala, E. Barua, P. Deb, A.B. Deoghare, "Physico-chemical and biological behaviour of eggshell bio-waste derived nano-hydroxyapatite matured at different aging time". *Mater. Today Commun.* vol.27, 102443, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102443>.
- [54] D. L. Goloshchapov et al., "Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by precipitation using hen's eggshell," *Ceram. Int.*, vol. 39, no. 4, pp. 4539–4549, 2013, doi: 10.1016/j.ceramint.2012.11.050.
- [55] M. Galván-Ruiz, J. Hernández, L. Baños, J. Noriega-Montes, and M. E. Rodríguez-García, "Characterization of Calcium Carbonate, Calcium Oxide, and Calcium Hydroxide as Starting Point to the Improvement of Lime for Their Use in Construction," *J. Mater. Civ. Eng.*, vol. 21, no. 11, pp. 694–698, Nov. 2009, doi: 10.1061/(asce)0899-1561(2009)21:11(694).
- [56] J. Carvalho, J. Araujo, and F. Castro, "Alternative low-cost adsorbent for water and wastewater decontamination derived from eggshell waste: An overview," *Waste and Biomass Valorization*, vol. 2, no. 2. Springer, pp. 157–167, May 07, 2011, doi: 10.1007/s12649-010-9058-y.

- [57] W. T. Tsai, J. M. Yang, C. W. Lai, Y. H. Cheng, C. C. Lin, and C. W. Yeh, "Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane," *Bioresour. Technol.*, vol. 97, no. 3, pp. 488–493, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.biortech.2005.02.050.
- [58] M. S. Tizo et al., "Efficiency of calcium carbonate from eggshells as an adsorbent for cadmium removal in aqueous solution," *Sustain. Environ. Res.*, vol. 28, no. 6, pp. 326–332, 2018, doi: 10.1016/j.serj.2018.09.002.
- [59] U. Anjaneyulu and S. Sasikumar, "Bioactive nanocrystalline wollastonite synthesized by sol-gel combustion method by using eggshell waste as calcium source," *Bull. Mater. Sci.*, vol. 37, no. 2, pp. 207–212, May 2014, doi: 10.1007/s12034-014-0646-5.
- [60] L. Habte, N. Shiferaw, D. Mulatu, T. Thenepalli, R. Chilakala, J. Ahn, "Synthesis of nano-calcium oxide from waste eggshell by sol-gel method", *Sustainability*, vol.11, no.11, 2019. 3196. <https://doi.org/10.3390/su11113196>.
- [61] S.M. Londoño-Restrepo, L.F. Zubieta-Otero, R. Jeronimo-Cruz, M.A. Mondragon, M.E. Rodriguez-García, "Effect of the crystal size on the infrared and Raman spectra of bio hydroxyapatite of human, bovine, and porcine bones", *J. Raman Spectrosc.* vol.50, no.8, 2019. 1–10. <https://doi.org/10.1002/jrs.5614>.
- [62] L.F. Zubieta-Otero, S.M. Londoño-Restrepo, G. Lopez-Chavez, E. Hernandez-Becerra, M.E. Rodriguez-Garcia, "Comparative study of physicochemical properties of bio-hydroxyapatite with commercial samples", *Mater. Chem. Phys.* vol.259 2021. 124201. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.124201>.
- [63] N.A.S. Mohd Pu'ad, J. Alipal, H.Z. Abdullah, M.I. Idris, T.C. Lee, "Synthesis of eggshell derived hydroxyapatite via chemical precipitation and calcination method", *Mater. Today Proc.* vol.42, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.11.276>.
- [64] H.K. Kim, H.S. Han, K.S. Lee, D.H. Lee, J.W. Lee, H. Jeon, S.Y. Cho, H.J. Roh, Y.C. Kim, H.K. Seok, "Comprehensive study on the roles of released ions from biodegradable Mg-5 wt% Ca-1 wt% Zn alloy in bone regeneration", *J. Tissue Eng. Regen. Med.* vol.1, 2017. 2710–2724. <https://doi.org/10.1002/TERM.2166>.
- [65] R.K. Rude, F.R. Singer, H.E. Gruber, "Skeletal and hormonal effects of magnesium deficiency", *J. Am. Coll. Nutr.* vol.28, 2009. 131–141. <https://doi.org/10.1080/07315724.2009.10719764>.
- [66] R.P. Heaney, "Role of Dietary Sodium in Osteoporosis", *J. Am. Coll. Nutr.* vol.25, 2006. 271S-276S. <https://doi.org/10.1080/07315724.2006.10719577>.
- [67] F. Yang, D. Yang, J. Tu, Q. Zheng, L. Cai, L. Wang, "Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating

Wnt/catenin signaling, *Stem Cells*”. vol. 29, 2011. 981–991.
<https://doi.org/10.1002/stem.646>.

- [68] J. Bejarano, R. Detsch, A.R. Boccaccini, H. Palza, “PDLLA scaffolds with Cu- and Zn-doped bioactive glasses having multifunctional properties for bone regeneration”, 2016. 1–11. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35952>.
- [69] C.T. Chasapis, A.C. Loutsidou, “Zinc and human health: an update”, pp.521–534, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0775-1>.
- [70] ASTM F1088-04a, Standard Specification for Beta-Tricalcium Phosphate for Surgical Implantation, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2010. <https://doi.org/10.1520/F1088-04AR10>.
- [71] M.D.L.A. Aguilera-Barreiro, J.A. Rivera-Márquez, H.M. Trujillo-Arriaga, J.A. Tamayo y Orozco, E. Barreira-Mercado, M.E. Rodríguez-García, “Intake of dehydrated nopal (*Opuntia ficus indica*) improves bone mineral density and calciuria in adult Mexican women”, *Food & nutrition research*, vol.57,no.1, 2013. 19106. <https://doi.org/10.3402/fnr.v57i0.19106>

ANEXOS

PDF#09-0432: QM=Indexed(I); d=Guinier(114.6mm); I=Other/Unknown

Hydroxylapatite, syn

Ca₅(PO₄)₃(OH) pinkish red, pinkish-red, blue

Radiation=CuKα1 Lambda=1.54056 Filter=

Calibration= 2T=10.820-78.227 I/Ic(RIR)=

Ref: de Wolff, P., Technisch Physische Dienst, Delft, The Netherlands.

ICDD Grant-in-Aid

Hexagonal - Powder Diffraction, P63/m (176) Z=2 mp=

CELL: 9.418 x 9.418 x 6.884 <90.0 x 90.0 x 120.0> P.S=hP44 (?)

Density(c)=3.160 Density(m)=3.080 Mwt=502.32 Vol=528.80

F(30)=54.6(.0157,35/0)

Ref: Ibid.

Strong Lines: 2.81/X 2.78/6 2.72/6 3.44/4 1.84/4 1.94/3 2.63/3 2.26/2 1.81/2 1.72/2

NOTE: See ICSD 22059 (PDF 01-073-0293); ICSD 22060 (PDF 01-073-0294); ICSD 24240 (PDF 01-073-1731); ICSD 26204 (PDF 01-074-0565); ICSD 26205 (PDF 01-074-566); ICSD 34457 (PDF 01-076-0694) and ICSD 203027 (PDF 01-084-1998).

I/I are peak values from a pattern which shows slight broadening of prism reflections.

Sample obtained following the procedure indicated by Hodge et al., Ind.

Eng.

Chem.

Anal.

Ed., 10 156 (1938).

Validated by calculated data 00-024-0033.

To replace 34-10.

2Theta	d(Å)	I(f)	(h k l)	Theta	1/(2d)	2pi/d
10.820	8.1700	12.0	(1 0 0)	5.410	0.0612	0.7691
16.841	5.2600	6.0	(1 0 1)	8.421	0.0951	1.1945
18.785	4.7200	4.0	(1 1 0)	9.392	0.1059	1.3312
21.819	4.0700	10.0	(2 0 0)	10.909	0.1229	1.5438
22.902	3.8800	10.0	(1 1 1)	11.451	0.1289	1.6194
25.354	3.5100	2.0	(2 0 1)	12.677	0.1425	1.7901
25.879	3.4400	40.0	(0 0 2)	12.939	0.1453	1.8265
28.126	3.1700	12.0	(1 0 2)	14.063	0.1577	1.9821
28.966	3.0800	18.0	(2 1 0)	14.483	0.1623	2.0400
31.773	2.8140	100.0	(2 1 1)	15.886	0.1777	2.2328
32.196	2.7780	60.0	(1 1 2)	16.098	0.1800	2.2618
32.902	2.7200	60.0	(3 0 0)	16.451	0.1838	2.3100
34.048	2.6310	25.0	(2 0 2)	17.024	0.1900	2.3881
35.480	2.5280	6.0	(3 0 1)	17.740	0.1978	2.4854
39.204	2.2960	8.0	(2 1 2)	19.602	0.2178	2.7366
39.818	2.2620	20.0	(3 1 0)	19.909	0.2210	2.7777
40.452	2.2280	2.0	(2 2 1)	20.226	0.2244	2.8201
42.029	2.1480	10.0	(3 1 1)	21.014	0.2328	2.9251
42.318	2.1340	4.0	(3 0 2)	21.159	0.2343	2.9443
43.804	2.0650	8.0	(1 1 3)	21.902	0.2421	3.0427
44.369	2.0400	2.0	(4 0 0)	22.184	0.2451	3.0800

45.305	2.0000	6.0	(2 0 3)	22.652	0.2500	3.1416
46.711	1.9430	30.0	(2 2 2)	23.356	0.2573	3.2338
48.103	1.8900	16.0	(3 1 2)	24.051	0.2646	3.3244
48.623	1.8710	6.0	(3 2 0)	24.311	0.2672	3.3582
49.468	1.8410	40.0	(2 1 3)	24.734	0.2716	3.4129
50.493	1.8060	20.0	(3 2 1)	25.246	0.2769	3.4791
51.283	1.7800	12.0	(4 1 0)	25.642	0.2809	3.5299
52.100	1.7540	16.0	(4 0 2)	26.050	0.2851	3.5822
53.143	1.7220	20.0	(0 0 4)	26.572	0.2904	3.6488
54.440	1.6840	4.0	(1 0 4)	27.220	0.2969	3.7311
55.879	1.6440	10.0	(3 2 2)	27.940	0.3041	3.8219
57.128	1.6110	8.0	(3 1 3)	28.564	0.3104	3.9002
58.073	1.5870	4.0	(5 0 1)	29.037	0.3151	3.9592
59.938	1.5420	6.0	(4 2 0)	29.969	0.3243	4.0747
60.457	1.5300	6.0	(3 3 1)	30.229	0.3268	4.1067
61.660	1.5030	10.0	(2 1 4)	30.830	0.3327	4.1804
63.011	1.4740	12.0	(5 0 2)	31.505	0.3392	4.2627
63.443	1.4650	4.0	(5 1 0)	31.721	0.3413	4.2889
64.078	1.4520	13.0	(3 2 3)	32.039	0.3444	4.3273
64.078	1.4520	13.0	(3 0 4)	32.039	0.3444	4.3273
65.031	1.4330	9.0	(5 1 1)	32.516	0.3489	4.3846
66.386	1.4070	4.0	(4 2 2)	33.193	0.3554	4.4657
66.386	1.4070	4.0	(4 1 3)	33.193	0.3554	4.4657
69.699	1.3480	3.0	(5 1 2)	34.850	0.3709	4.6611
71.651	1.3160	5.0	(4 0 4)	35.826	0.3799	4.7745
71.651	1.3160	5.0	(4 3 1)	35.826	0.3799	4.7745
72.286	1.3060	4.0	(2 0 5)	36.143	0.3828	4.8110
72.286	1.3060	4.0	(5 2 0)	36.143	0.3828	4.8110
73.995	1.2800	7.0	(4 2 3)	36.998	0.3906	4.9087
75.022	1.2650	3.0	(3 2 4)	37.511	0.3953	4.9669
75.022	1.2650	3.0	(6 0 2)	37.511	0.3953	4.9669
75.583	1.2570	9.0	(2 1 5)	37.792	0.3978	4.9986
76.154	1.2490	1.0	(4 3 2)	38.077	0.4003	5.0306
77.175	1.2350	11.0	(5 1 3)	38.587	0.4049	5.0876
78.227	1.2210	9.0	(5 2 2)	39.114	0.4095	5.1459

PDF#47-1743: QM=Common(+); d=Calculated; I=(Unknown)

Calcite

CaCO₃

Radiation=CuKα1 Lambda=1.5406 Filter=

Calibration= 2T=23.053-135.719 I/Ic(RIR)=

Ref: Level-1 PDF

Hexagonal, R-3c(167) Z=6 mp=

CELL: 4.9896 x 4.9896 x 17.061 <90.0 x 90.0 x 120.0> P.S=

Density(c)=2.711 Density(m)= Mwt= Vol=367.9

Ref: Ibid.

Strong Lines: 3.04/X 1.88/2 1.91/2 2.28/2 2.09/2 2.49/1 1.60/1 3.85/1

2-Theta	d(Å)	I(f)	(h k l)	Theta	1/(2d)	2pi/d
23.053	3.8548	8.9	(0 1 2)	11.527	0.1297	1.6300
29.400	3.0355	100.0	(1 0 4)	14.700	0.1647	2.0699
31.435	2.8435	2.2	(0 0 6)	15.717	0.1758	2.2097
35.968	2.4948	14.7	(1 1 0)	17.984	0.2004	2.5185
39.408	2.2846	20.2	(1 1-3)	19.704	0.2189	2.7502
43.157	2.0944	16.1	(2 0 2)	21.579	0.2387	3.0000
47.113	1.9274	7.0	(0 2 4)	23.556	0.2594	3.2600
47.505	1.9124	21.7	(0 1 8)	23.752	0.2615	3.2855
48.503	1.8753	23.2	(1 1-6)	24.252	0.2666	3.3505
56.561	1.6258	4.2	(1 2-1)	28.280	0.3075	3.8647
57.397	1.6041	11.8	(1 2 2)	28.698	0.3117	3.9170
58.078	1.5869	1.2	(1 0 10)	29.039	0.3151	3.9595
60.666	1.5252	6.6	(1 2-4)	30.333	0.3278	4.1195
60.996	1.5178	3.0	(2 0 8)	30.498	0.3294	4.1397
61.372	1.5094	3.6	(1 1-9)	30.686	0.3313	4.1628
63.050	1.4732	2.7	(2 1-5)	31.525	0.3394	4.2651
64.658	1.4404	8.4	(3 0 0)	32.329	0.3471	4.3622
65.610	1.4217	4.8	(0 0 12)	32.805	0.3517	4.4193
69.184	1.3568	1.9	(1 2-7)	34.592	0.3685	4.6310
70.239	1.3390	3.1	(0 2 10)	35.119	0.3734	4.6926
72.890	1.2967	3.7	(2 1-8)	36.445	0.3856	4.8457
73.665	1.2849	0.8	(0 3 6)	36.832	0.3891	4.8899
76.269	1.2474	1.5	(2 2 0)	38.134	0.4008	5.0370
77.157	1.2352	2.8	(1 1-12)	38.579	0.4048	5.0866
80.938	1.1868	0.8	(1 3-2)	40.469	0.4213	5.2942
81.521	1.1798	3.7	(1 2-10)	40.761	0.4238	5.3257
82.103	1.1729	0.5	(0 1 14)	41.051	0.4263	5.3570
83.766	1.1538	6.8	(1 3 4)	41.883	0.4334	5.4457
84.802	1.1423	3.5	(2 2-6)	42.401	0.4377	5.5004
86.456	1.1247	0.9	(2 1-11)	43.228	0.4446	5.5867
93.053	1.0614	1.4	(2 0 14)	46.527	0.4711	5.9195
94.708	1.0472	4.9	(4 0 4)	47.354	0.4775	5.9999
94.998	1.0448	5.3	(1 3-8)	47.499	0.4786	6.0139
96.156	1.0352	2.5	(1 0 16)	48.078	0.4830	6.0692
96.197	1.0349	0.8	(1 1-15)	48.099	0.4831	6.0712

97.693	1.0230	0.6	(1 2-13)	48.846	0.4887	6.1418
99.152	1.0118	5.4	(3 0 12)	49.576	0.4941	6.2097
102.215	0.9897	0.7	(2 3-1)	51.108	0.5052	6.3488
102.933	0.9847	2.7	(3 2-2)	51.466	0.5078	6.3808
103.525	0.9807	0.6	(3 1-10)	51.762	0.5098	6.4069
104.118	0.9767	2.4	(2 1-14)	52.059	0.5119	6.4330
105.827	0.9656	1.8	(2 3-4)	52.913	0.5178	6.5071
106.126	0.9637	4.4	(0 4 8)	53.063	0.5188	6.5199
107.330	0.9562	1.0	(0 2 16)	53.665	0.5229	6.5710
108.024	0.9520	0.6	(3 2-5)	54.012	0.5252	6.6002
109.549	0.9429	4.2	(4 1 0)	54.774	0.5303	6.6634
110.468	0.9377	1.9	(2 2-12)	55.234	0.5332	6.7009
114.033	0.9183	0.6	(2 3-7)	57.017	0.5445	6.8423
117.932	0.8990	1.9	(3 2-8)	58.966	0.5562	6.9894
118.775	0.8950	1.8	(4 1-6)	59.388	0.5586	7.0202
119.244	0.8929	2.2	(1 2-16)	59.622	0.5600	7.0371
120.766	0.8860	2.8	(1 1-18)	60.383	0.5643	7.0913
127.238	0.8598	0.6	(5 0 2)	63.619	0.5815	7.3075
127.965	0.8571	3.2	(2 3-10)	63.983	0.5833	7.3304
128.540	0.8551	0.6	(2 1-17)	64.270	0.5848	7.3482
128.700	0.8545	0.8	(1 3-14)	64.350	0.5851	7.3532
130.848	0.8470	2.5	(0 5 4)	65.424	0.5903	7.4181
133.969	0.8369	3.1	(0 1 20)	66.985	0.5974	7.5077
134.491	0.8353	0.8	(3 2-11)	67.246	0.5986	7.5222
135.719	0.8316	1.6	(3 3 0)	67.860	0.6013	7.5555

PDF#04-0777(Deleted): QM=Uncommon(?); d=Diffractometer; I=(Unknown)

Lime, syn

CaO

Radiation=CuKa1 Lambda=1.5406 Filter=

Calibration= 2T=32.196-147.763 I/Ic(RIR)=

Ref: Level-1 PDF

Cubic, Fm-3m(225) Z=4 mp=

CELL: 4.8105 x 4.8105 x 4.8105 <90.0 x 90.0 x 90.0> P.S=

Density(c)=3.345 Density(m)= Mwt= Vol=111.3

Ref: Ibid.

Strong Lines: 2.40/X 1.70/5 2.78/3 1.45/1 1.08/1 0.98/1 0.80/1 1.39/1

2-Theta	d(Å)	I(f)	(h k l)	Theta	1/(2d)	2pi/d	n ²
32.196	2.7780	34.0	(1 1 1)	16.098	0.1800	2.2618	3
37.360	2.4050	100.0	(2 0 0)	18.680	0.2079	2.6126	4
53.852	1.7010	45.0	(2 2 0)	26.926	0.2939	3.6938	8
64.127	1.4510	10.0	(3 1 1)	32.064	0.3446	4.3302	11
67.306	1.3900	5.0	(2 2 2)	33.653	0.3597	4.5203	12
79.628	1.2030	4.0	(4 0 0)	39.814	0.4156	5.2229	16
88.529	1.1036	4.0	(3 3 1)	44.264	0.4531	5.6934	19
91.484	1.0755	9.0	(4 2 0)	45.742	0.4649	5.8421	20
103.345	0.9819	9.0	(4 2 2)	51.673	0.5092	6.3990	24
112.613	0.9258	3.0	(5 1 1)	56.306	0.5401	6.7868	27
129.859	0.8504	4.0	(4 4 0)	64.929	0.5880	7.3885	32
142.645	0.8131	5.0	(5 3 1)	71.323	0.6149	7.7274	35
147.763	0.8018	6.0	(6 0 0)	73.881	0.6236	7.8364	36

PDF#04-0733: QM=Indexed; d=(Unknown); I=Diffractometer

Portlandite, syn

Ca(OH)₂

Radiation=CuKα1 Lambda=1.54056 Filter=Ni

Calibration= d-Cutoff= I/Ic(RIR)=1.40

Ref= Swanson, Tatge.

Natl. Bur. Stand. (U.S.), Circ. 539, I 58 (1953)

Hexagonal - Powder Diffraction, P-3m1 (164) Z=1 mp=

Cell=3.593x4.909 Pearson=hP5 (Structure C6, Cd I2)

Density(c)=2.241 Density(m)= Mwt=74.09 Vol=54.88 F(28)=13.9(0.052,39)

Ref= Ibid.

Strong Line: 2.63/X 4.90/7 1.93/4 1.80/4 3.11/2 1.69/2 1.48/1 1.45/1 1.06/1 1.14/1

NOTE: Levi, Giorn, Chim.

Ind.

Applicata, 6 333-7 (1924).

NBS analysis shows about 0.21% MgO, 0.1% Ba and no other impurities over 0.04%.

Pattern taken at 27 C.

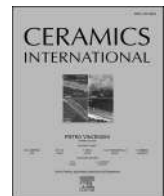
d(A)	I(f)	I(v)	h	k	l	n ²	2-Theta	Theta	1/(2d)	2pi/d
4.900	74.0	40.0	0	0	1		18.089	9.044	0.1020	1.2823
3.112	23.0	19.0	1	0	0		28.662	14.331	0.1607	2.0190
2.628	100.0	100.0	1	0	1		34.088	17.044	0.1903	2.3909
2.447	3.0	3.0	0	0	2		36.696	18.348	0.2043	2.5677
1.927	42.0	57.0	1	0	2		47.123	23.561	0.2595	3.2606
1.796	36.0	53.0	1	1	0		50.794	25.397	0.2784	3.4984
1.687	21.0	33.0	1	1	1		54.336	27.168	0.2964	3.7245
1.634	1.0	2.0	0	0	3		56.251	28.126	0.3060	3.8453
1.557	3.0	5.0	2	0	0		59.303	29.651	0.3211	4.0354
1.484	13.0	23.0	2	0	1		62.538	31.269	0.3369	4.2340
1.449	13.0	24.0	1	1	2		64.226	32.113	0.3451	4.3362
1.314	8.0	16.0	2	0	2		71.777	35.889	0.3805	4.7817
1.228	1.0	2.0	0	0	4		77.697	38.849	0.4072	5.1166
1.211	1.0	2.0	1	1	3		78.999	39.499	0.4129	5.1884
1.176	3.0	7.0	2	1	0		81.822	40.911	0.4251	5.3419
1.143	11.0	25.0	2	1	1		84.721	42.360	0.4374	5.4961
1.127	2.0	5.0	2	0	3		86.185	43.092	0.4435	5.5727
1.059	12.0	30.0	2	1	2		93.229	46.614	0.4717	5.9281
1.036	5.0	13.0	3	0	0		95.989	47.995	0.4823	6.0613
1.014	7.0	18.0	3	0	1		98.826	49.413	0.4930	6.1946
0.955	4.0	11.0	2	1	3		107.509	53.755	0.5235	6.5786
0.936	1.0	3.0	1	0	5		110.603	55.301	0.5337	6.7064
0.897	1.0	3.0	2	2	0		118.156	59.078	0.5569	6.9976
0.883	2.0	6.0	2	2	1		121.280	60.640	0.5657	7.1093
0.876	1.0	3.0	3	0	3		123.120	61.560	0.5708	7.1726
0.862	2.0	6.0	3	1	0		126.578	63.289	0.5798	7.2865
0.849	6.0	19.0	2	1	4		130.119	65.059	0.5886	7.3963
0.814	5.0	16.0	3	1	2		142.272	71.136	0.6143	7.7189

PUBLICACIONES



Contents lists available at ScienceDirect

Ceramics International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ceramint

Synthesis and characterization of bioinspired nano-hydroxyapatite by wet chemical precipitation

Omar M. Gomez-Vazquez^a, Brandon A. Correa-Piña^a, Luis F. Zubieta-Otero^a,
Angelica M. Castillo-Paz^b, Sandra M. Londoño-Restrepo^{c,*}, Mario E. Rodriguez-García^c

^a Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, Qro, C.P. 76230, Mexico

^b Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Querétaro, Querétaro, Qro, C.P. 76230, Mexico

^c Departamento de Nanotecnología, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, Qro, C.P. 76230, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Hen eggshells
Trace minerals
Synthesis route
Morphology
Structural properties

ABSTRACT

In this work, nanometric hydroxyapatite was added with mineral traces naturally present in mammalian bones. It was synthesized by wet chemical precipitation using $\text{Ca}(\text{OH})_2$ obtained from eggshells as a precursor. Subsequent calcination was performed at a low temperature of 250 °C to remove reaction by-products but avoiding the crystal size transition to micrometric sizes. Synthetic hydroxyapatite crystals exhibited irregular-spherical morphologies with a Feret's diameter ranging from 10 to 90 nm. Most importantly, this hydroxyapatite contains levels of Ca, Mg, P, Na, S, Sr, K, Si, Fe, Al, and Ba, close to those reported for mammalian bones. The analysis of the commercial synthetic hydroxyapatite revealed that its crystals form micrometric-like-flakes clusters that do not have additional ions but only Ca and P.

1. Introduction

Nowadays, the demand for biomaterials for clinical applications is increasing. Hydroxyapatite (HAP; $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) is one of the prevailing biomaterials for bone regeneration. There are several methods to obtain it; however, two routes are the most common. The first one starts from mammalian bones, while the second route is based on synthesis processes using different chemicals. HAP from mammalian bones contains minority ions such as Mg, Na, K, Fe, and Si, which play essential roles in osteointegration. These ions have proven to be capable of inducing bone cell differentiation and stimulating bone tissue growth. O'Neill et al. [1] pointed out that the advantages of using these ions outrun protein growth factors because of their low cost, simplicity, stability, and efficacy. Magnesium enhances bone-to-implant contact, for instance. On the other hand, synthesis routes commonly do not include these ions, and some syntheses have only managed to introduce some of them. Regardless of the chosen route, incineration at high temperatures is carried out to obtain HAP free of organic compounds or other crystalline phases. The calcination requires control on the heating rate [2,3], sintering temperature [4], cooling rate [5], and atmosphere [6,7].

Incineration removes reaction by-products, but the high temperatures affect the physicochemical properties of the HAP.

One of the main problems associated with incineration is the sintering temperature. It has been reported that HAPs from humans, bovine, and porcine bones are composed of nanometric and highly ordered crystals [2]. Moreover, the nanocrystal coalescence produces a size transition from nano to micro around 720 °C as proved by Londoño-Restrepo et al. [8]. This temperature limits any thermal process used for sintering nanometric hydroxyapatites with clinical purposes. However, calcination temperatures are still reported from 100 to 1200 °C [9–12].

Some HAP synthesis processes using eggshells as a precursor have already been published. Rivera et al. [10] used a hydrothermal method with CaO from eggshells and $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ as reagents. Their process ended with calcination at 1050 °C for 3 h and 10 °C/min heating rate. However, the X-ray patterns showed that HAP was not the only phase present since part of the CaO did not react. Gergely et al. [13] used a mechanical approach to synthesize the HAP using a ball mill machine. Still, other calcium phosphates were also synthesized during the reaction as by-products that could not be removed after calcination at 900 °C.

* Corresponding author.

E-mail address: smile2508@comunidad.unam.mx (S.M. Londoño-Restrepo).

<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.08.174>

Received 23 June 2021; Received in revised form 4 August 2021; Accepted 15 August 2021

Available online 16 August 2021

0272-8842/© 2021 Published by Elsevier Ltd.

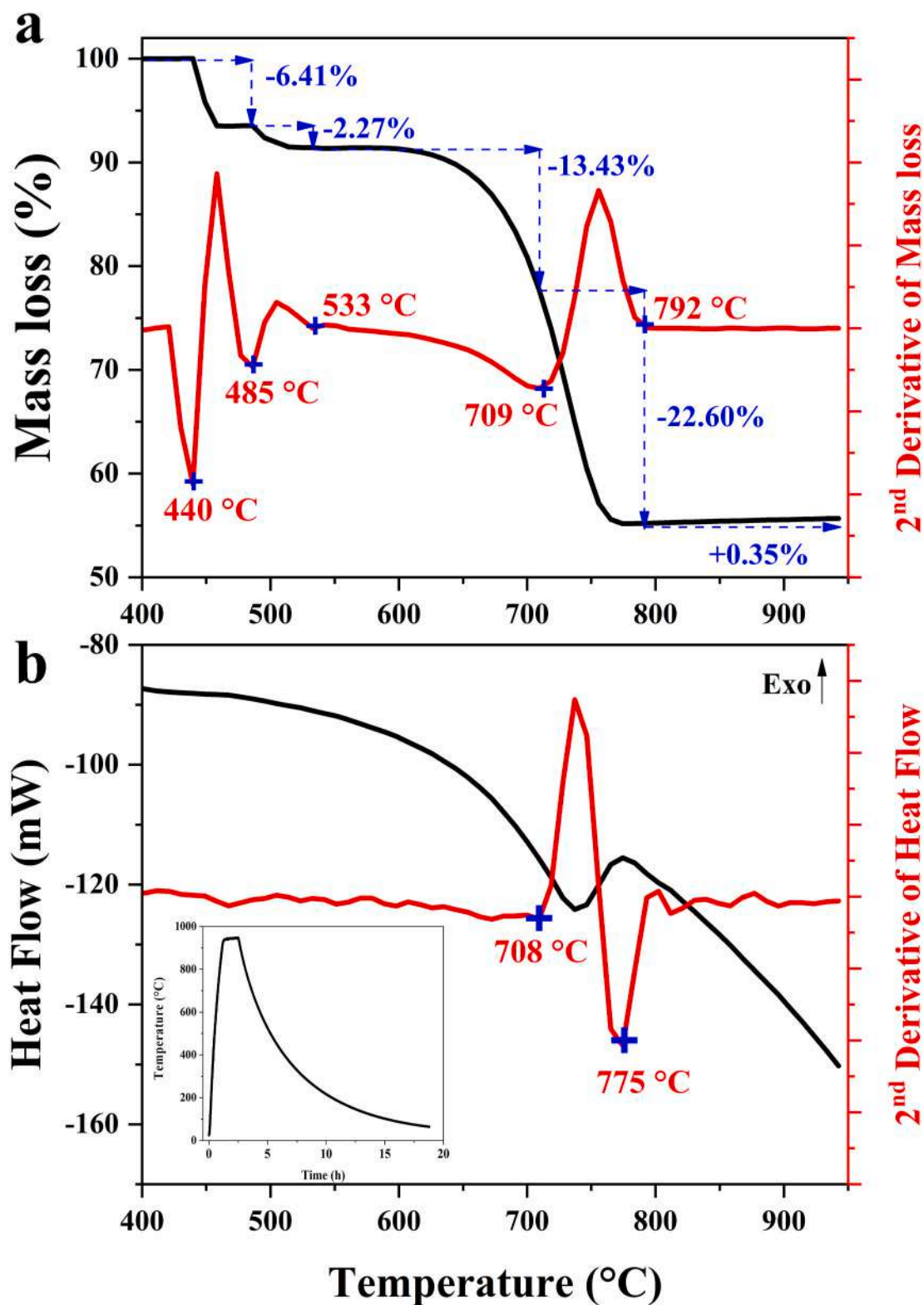


Fig. 1. (a) TGA curve for Raw-E and its second derivative. (b) DSC thermogram for Raw-E and its second derivative.

Sadat-Shojai et al. [14] presented a review of methods of synthesis of nanosized HAp. They showed that pH and the concentration of the precursors govern the HAp morphology. Thus, it is crucial to control the pH and concentrations in the reaction, and at the end, to manage the sintering temperature.

The objective of this work was to synthesize nanometric HAp added with the minority ions throughout wet chemical precipitation using Ca

(OH)₂ from eggshells and calcination at a low temperature. The first part is related to the methodology used to get calcium hydroxide (Ca(OH)₂) from hen eggshells through the lime cycle. The second part focused on the HAp synthesis avoiding the crystal size transition of the crystals.

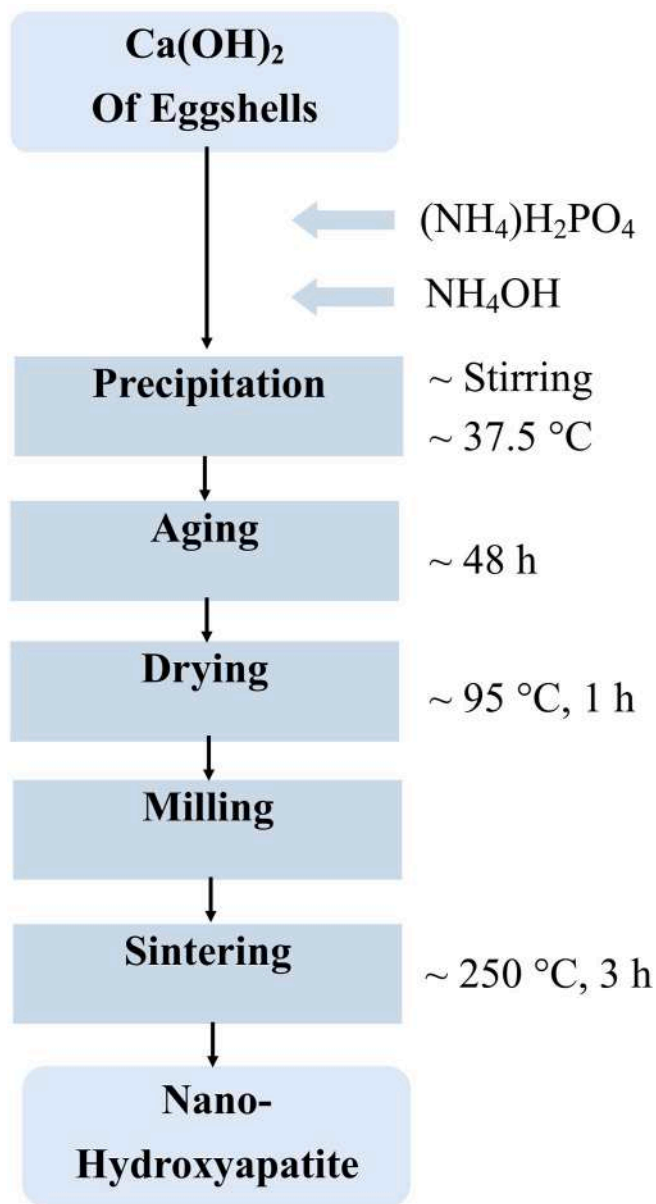


Fig. 2. Process diagram for synthesizing hydroxyapatite using eggshells.

2. Materials and methods

2.1. Ca(OH)₂ obtaining from eggshells

Hen eggshells from *Bachoco-Company*, Querétaro-México were boiled in distilled water to remove impurities and the protein membrane. Next, these eggshells were analyzed by Thermogravimetric analysis and differential scanning calorimetry. Based on the results, clean eggshells were calcined at 550 and 950 °C to obtain CaCO₃ and CaO, respectively. The calcined eggshell at 950 °C was soaked in distilled water for 2 months.

4 mg of clean powdered eggshells (74 μm) was placed in an alumina crucible and heated from room temperature (25 °C) to 900 °C at 5 °C/min in an oxygen atmosphere inside a Mettler Toledo model TGA/DSC apparatus. Fig. 1(a) shows the TG curve for this sample and its second derivative to correctly identify the mass loss regions. In this way, four mass loss regions and one mass increase were found. The first one (440–485 °C; 6.41%) corresponds to protein denaturalization; the second loss (485–553 °C; 2.27%) is due to the degradation of the primary

structure of the proteins; the third loss (553–709 °C; 13.43%) is related to carbohydrates degradation. Both protein and carbohydrates come from the eggshell membrane [15]. The last loss (709–792 °C; 22.60%) corresponds to the endothermal transition in which CO₂ releases from CaCO₃ (Fig. 1(b)). The slightly mass gain (0.35%) at the end of the TG curve is due to a CaO re-carbonation because of the CO₂ available in the air. Based on these findings, eggshells were calcined at 950 °C (see inset on Fig. 1(b)) under quasi-static conditions for 3 h. Samples were labeled as follows for their physicochemical characterization: eggshells calcined at 550 °C (CaCO₃-E), eggshells calcined at 950 °C (CaO-E), and CaO-E stirred in distilled water by 24 h (Ca(OH)₂-E). Commercial reagents from J.T. Baker were used as a control: calcium carbonate (99.9%; CaCO₃-C), calcium oxide (99.9%; CaO-C), and calcium hydroxide (96.4%, Ca(OH)₂-C).

2.2. Hydroxyapatite synthesis by wet chemical precipitation method

Nanohydroxyapatite was obtained by the wet chemical precipitation method reported by Sadat-Shojai et al. [14]. 0.6 M (NH₄)H₂PO₄ (99.1%, J.T. Baker, Mexico; code 0776-01) was reacted with 1.0 M Ca(OH)₂-E drop by drop and assisted with stirring and heating at 37.5 °C. pH = 9 was controlled by adding NH₄OH (28.0–30.0%, J.T. Baker, USA; code 9721-02) and using a Hanna Instruments (HI2020) pH-meter. At the end of the reaction, it was aged 48 h. Then, the wet powder was filtered and dried at 94 °C for 1 h. Finally, the sample was pulverized, sieved (US mesh 100; 147 μm), and calcined at 250 °C for 3 h to remove reaction by-products. This sample was labeled as HAp-E, and one commercial hydroxyapatite from Sigma Aldrich (HAp-C) was used for comparative reasons. The process diagram is shown in Fig. 2.

2.3. Elemental composition by ICP-OES

The mineral content of Raw-E, HAp-E, and HAp-C was determined using an Inductively Coupled Plasma optical emission spectrometer (ICP-OES, model Thermo iCAP 6500 Duo View). 0.1 g of each sample was digested with nitric acid (Baker 69–70%). Digested samples were excited by exposing them to an argon plasma, and upon return to the ground state, the elements were identified by their characteristic emission spectra. Emission intensity was then converted to elemental concentration by comparing it to a standard curve.

2.4. Morphological analysis by HR-SEM and HR-TEM

Morphology of CaCO₃-E, CaO-E, Ca(OH)₂-E, HAp-E, and HAp-C was studied with a Hitachi SU8230 scanning electron microscope (SEM). The samples were fixed on a copper holder with carbon tape, and the analysis conditions used 1 kV electron acceleration voltage at 12–20 Pa pressure. HAp-E and HAp-C were also analyzed by transmission electron microscopy (TEM) for a complimentary analysis of the morphology of the synthetic hydroxyapatites and their crystal size distribution. Measurements were carried out in a JEOL JEM-2200 FS. Both samples were dispersed in isopropanol using an ultrasonic homogenizer (UP200Ht; Hielscher) before the analysis. 2 μL each sample was put on a copper grid; the microscope was operated at 200 kV. Light-field images were taken and analyzed with the Digital Micrograph software (Gatan).

2.5. Particle size: dynamic light scattering (DLS)

DLS measurements for HAp-E and HAp-C before aging were carried out on an Anton Paar Litesizer 500.1 mL of each sample in isopropyl alcohol was measured at 20 °C in disposable cuvettes by triplicate. The medium refractive index was 1.3772, and viscosity of 2.4 cP. Kalliope software automatically adjusted the optical parameters (measurement angle, filter optical density, and focus position), making measurements with a 658 nm semiconductor laser of 40 mW.

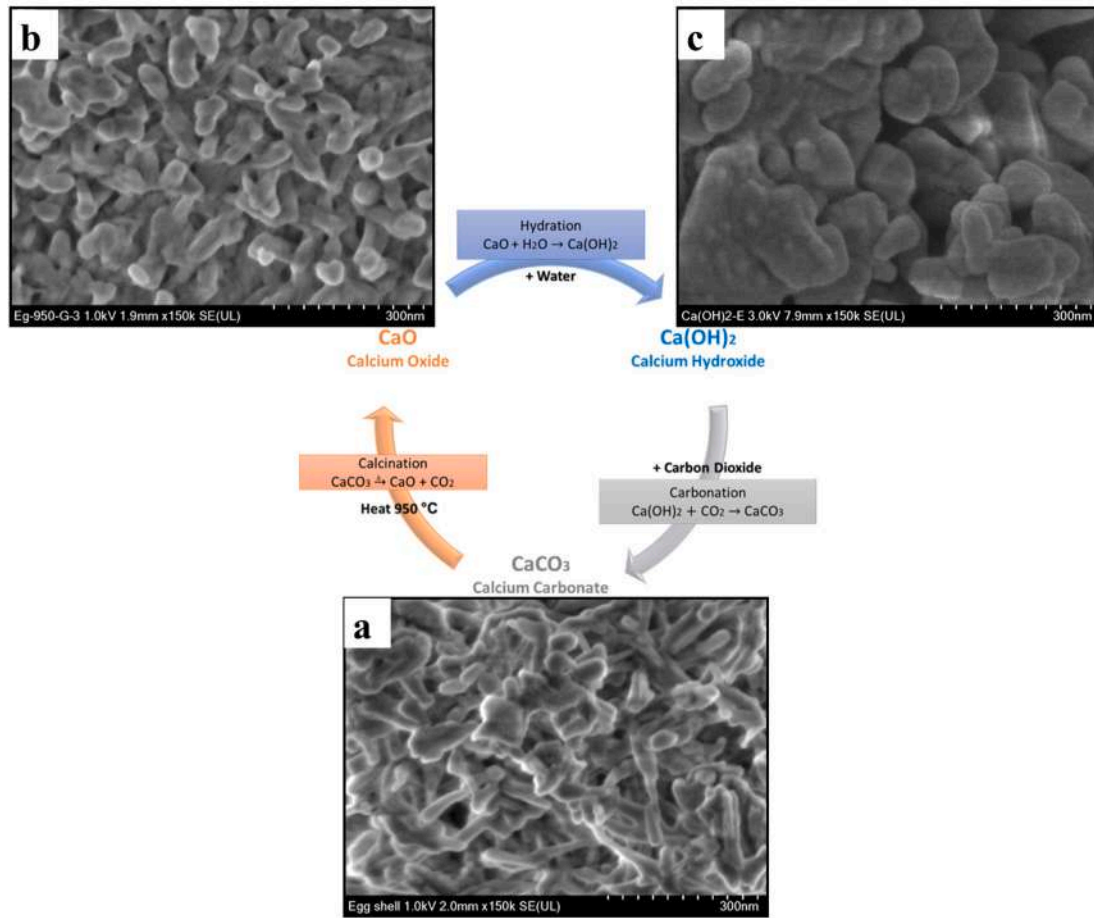


Fig. 3. Lime cycle for eggshells.

Table 1

Mineral content of eggshells (Raw-E), HAp from humans bones (HAp-H), HAp from bovine bones (HAp-B), HAp from porcine bones (HAp-P), HAp synthesized from eggshells (HAp-E), and Sigma Aldrich HAp (HAp-C).

Mineral (ppm)	Raw-E	CaCO ₃ -E	^a HAp-H	^a HAp-B	^a HAp-P	HAp-E	HAp-C
Ca	428404	508639	285898	217222	216983	304417	425142
Mg	4436	5339	3887	4156	4184	3621	ND
P	1405	1707	107267	120648	161878	157998	125240
Na	990	1012	7912	4708	4345	312	ND
S	788	683	26	665	685	252	ND
Sr	240	280	90	ND	134	127	ND
K	267	268	56	127	240	316	ND
Si	34	45	120	21	331	125	ND
Fe	17	22	89.2	ND	17	15	12
Al	17	20	37	ND	16	28	6
Zn	ND	29	179	83	185	124	4
Ba	28.63	34	NR	NR	NR	16	ND
Cu	ND	4	NR	NR	NR	12	ND
Mn	ND	ND	NR	NR	NR	1	ND
Ni	ND	ND	NR	NR	NR	39	ND
Tl	ND	ND	NR	NR	NR	19	ND
Pb	ND	ND	NR	NR	NR	1	ND
Ca/P	-		2.06	1.39	1.04	1.49	2.62

^a Londoño-Restrepo et al. [2], ND: Non-detected, NR: Non-reported.

2.6. X-ray diffraction characterization

The powder X-ray diffraction patterns of commercial samples: CaCO₃-C, CaO-C, Ca(OH)₂-C, and HAp-C; the obtained precursors of eggshell: Raw-E (uncalcined eggshells), CaCO₃-E, CaO-E, Ca(OH)₂-E; and HAp-E were carried out with a Rigaku Ultima IV diffractometer operating at 40 kV, 30 mA with a CuK radiation wavelength of $\lambda =$

1.5406 Å. Diffractograms were taken from 15 to 75 in a 2θ scale and 0.02 step size. The powder samples were densely packed into a zero background.

2.7. Functional groups: FT-IR analysis

Fourier transform infrared spectroscopy was used to study the

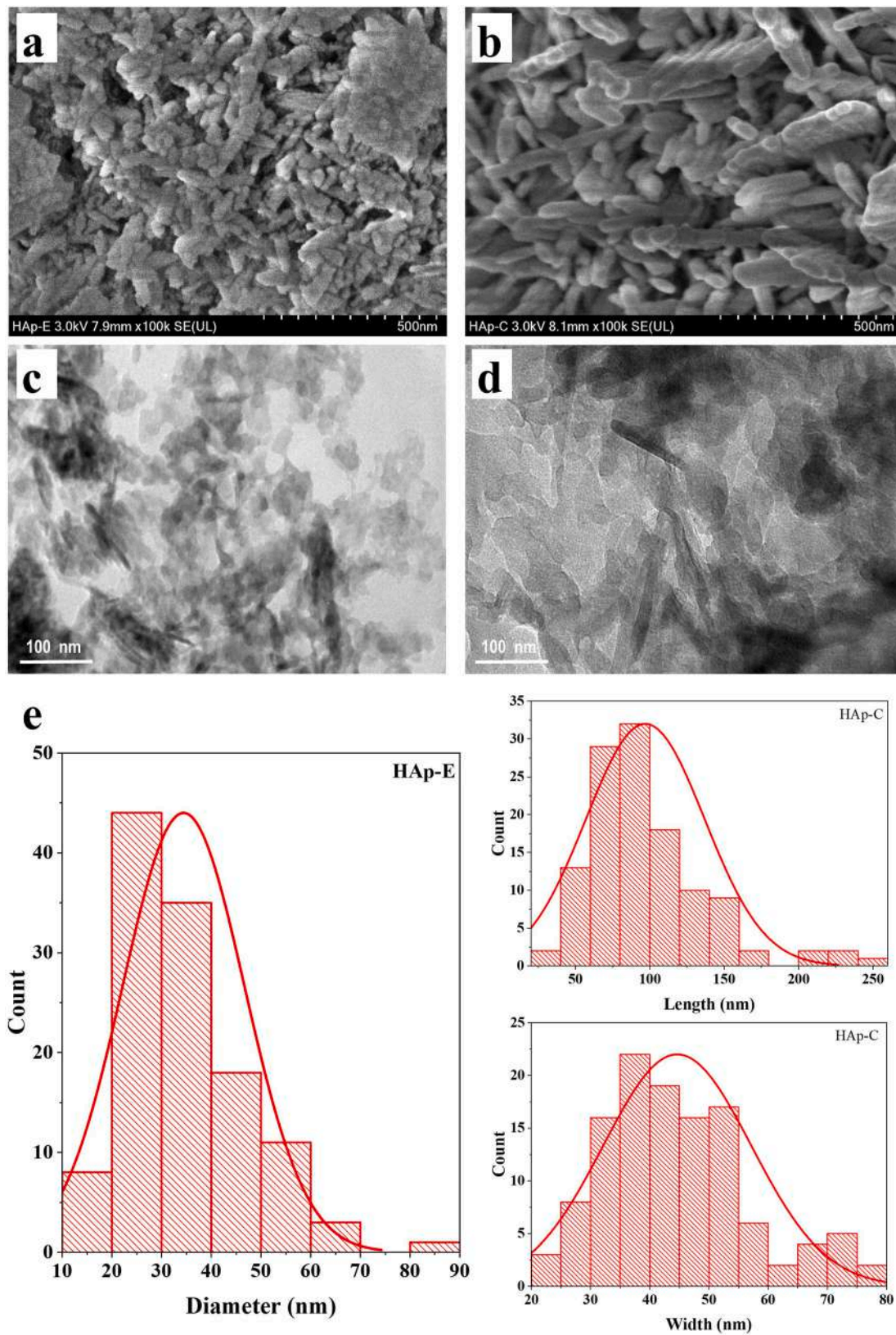


Fig. 4. HR-SEM images of (a) HAp-E and (b) HAp-C at 100000 \times . HR-TEM images of (c) HAp-E and (d) HAp-C at 100000 \times . (e) Crystal size distribution for HAp-E and HAp-C.

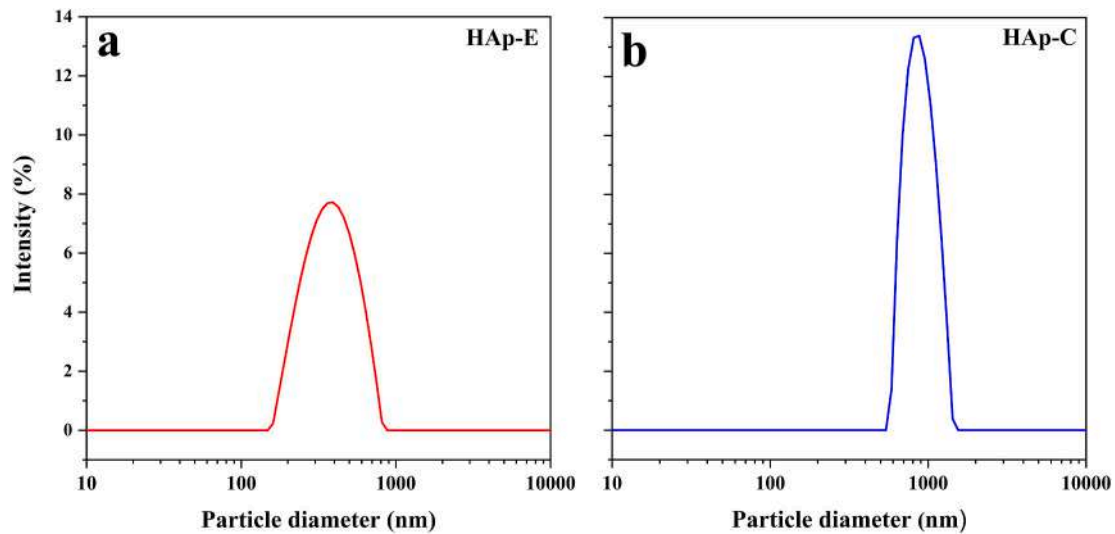


Fig. 5. Particle size distribution for (a) HAp-E and (b) HAp-C by DLS.

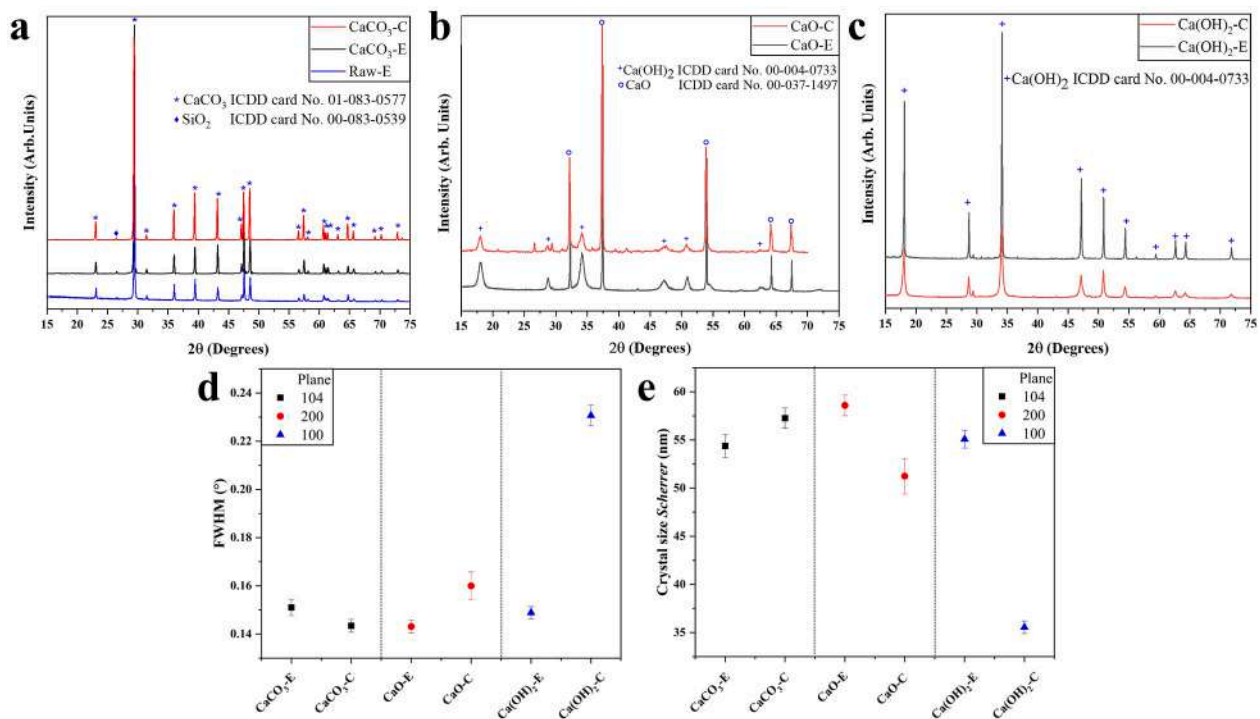


Fig. 6. X-ray diffraction patterns of (a) Raw-E, $\text{CaCO}_3\text{-E}$, and $\text{CaCO}_3\text{-C}$. (b) CaO-E and CaO-C . (c) $\text{Ca(OH)}_2\text{-E}$ and $\text{Ca(OH)}_2\text{-C}$. (d) FWHM of commercial and eggshells CaCO_3 , CaO , and Ca(OH)_2 . (E) Crystal size determination by the Scherrer's equation.

vibrational states of commercial samples: $\text{CaCO}_3\text{-C}$, CaO-C , $\text{Ca(OH)}_2\text{-C}$, HAp-C; samples obtained from eggshells: Raw-E, $\text{CaCO}_3\text{-E}$, CaO-E , $\text{Ca(OH)}_2\text{-E}$, and HAp-E. Spectra were performed on a PerkinElmer Spectrum Two equipped with an ATR (attenuated total reflectance) accessory with a diamond crystal in the spectral range of $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ and a spectral resolution of 2 cm^{-1} .

3. Results and discussion

3.1. Morphological analysis of the eggshells lime cycle

Fig. 3 shows the lime cycle from hen eggshells that starts with CaCO_3 , producing CaO after calcination at $950\text{ }^\circ\text{C}$ (see Reaction (1)). This

endothermic transition occurs between 709 and $792\text{ }^\circ\text{C}$ (Fig. 1(a)).



$\text{CaCO}_3\text{-E}$ SEM image (Fig. 3(a)) reveals this sample is formed by elongated nanocrystals that, after calcination at $950\text{ }^\circ\text{C}$ (Fig. 3(b)), turns into CaO-E but keeping the size ($40\text{--}100\text{ nm}$ length and $40\text{--}60\text{ nm}$ thickness) and shape. CaO-E was hydrated with deionized water (1:5 ratio). Water initialized an endothermic transition that produces Ca(OH)_2 (see Reaction (2)). Fig. 3(c) shows the HR-SEM image of Ca(OH)_2 after soaking for two months formed by nanocrystals cumuli ($30\text{--}100\text{ nm}$).



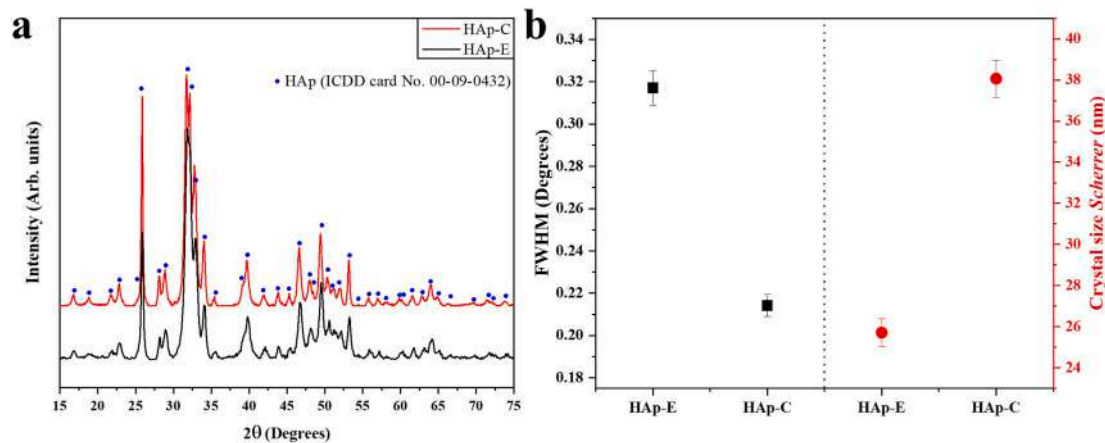
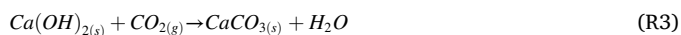


Fig. 7. X-ray diffraction patterns of (a) hydroxyapatite from eggshells (HAp-E) and hydroxyapatite of Sigma-Aldrich (HAp-C). (b) FWHM and crystal size by the Scherrer's equation.

Although energy release in this reaction is abrupt, more time is required for a complete conversion. In the end, the solid nearly doubles its volume. In this work, Reaction (2) was completed after two months, using a closed container to avoid carbonation (Reaction (3)) that closed the lime cycle, returning to the starting point as was reported by Ref. [16].



$\text{Ca}(\text{OH})_2$ purity depends on the high control during the lime cycle.

3.2. Mineral content

Table 1 shows the mineral content of Raw-E, HAp-E, and HAp-C, as well as hydroxyapatites from humans (HAp-H), bovine (HAp-B), and porcine (HAp-P) bones elsewhere reported [2]. HAp-E exhibits higher mineral content values than Raw-E as a concentration effect after removing organics from eggshells, as shown in the TGA analysis of eggshells. It is worth noting that HAp-E contains the same minerals as humans, bovine, and porcine hydroxyapatites. Most importantly, the level content of these ions is close to the reported values for the mammalian hydroxyapatites. Ions in eggshells could help the HAp in different functions in the osteoconductivity and osseointegration of bone regeneration. For example, magnesium is one of the essential ions. It helps bone formation by inducing proliferation, differentiation, alkaline phosphatase (ALP) activity, mineral deposition in osteoblastic cells, and osteoclast differentiation decreasing and activity [17]. A decrease in Mg levels results in osteoporosis [18]. Sodium is crucial for osteoactivity since a high Na is in the extracellular fluid (ECF), bathing the bone-forming site during its mineralization [19]. Strontium, for its part, plays a role important in bone regeneration because of its similarity with Ca. Sr participates in the mesenchymal stem cells (MSC) differentiation, regulating the expression of osteoblast marker genes, such as Runx2, OCN, osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP), and type 1 collagen, and increasing ALP activity and matrix mineralization [20]. Ions like Zn and Cu are essential to enzymatic activities, promote angiogenesis upregulated VEGF, and stimulate endothelial cell proliferation [21,22].

HAp-E meets the F1088-04a ASTM International standard [23] since Hg, As, and Cd in HAp-E are not present, and just 1 ppm Pb was found (max 30 ppm). The commercial synthetic hydroxyapatite (HAp-C) only contains Ca and P, as expected. The presence of Al and Zn could stem from mineral traces that reagents have. The Ca/P atomic ratio for HAp-H, HAp-B, HAp-P, HAp-E, and HAp-C was calculated and included at the bottom of Table 1. Pure stoichiometric hydroxyapatite has a Ca/P atomic ratio of 1.67 (Ca: 39.89%; O: 41.41%; H: 0.20%; P: 18.50%). HAp-H and HAp-C from Sigma Aldrich exhibit a higher Ca/P ratio than

the theoretical value. HAp-H presents both Ca and P deficiency related to its synthesis process in the human body and the mineral reserve. Moreover, human bones always exhibit low Ca and P values after the peak of the mineral density (34–36 years) [24]. In HAp-C, the higher Ca/P ratio than 1.67 is due to the synthesis process in which the hydroxyapatite is Ca-rich but P-deficient. HAp-B, HAp-P, and HAp-E present low Ca/P ratios also related to their Ca and P low levels due to mineral traces in substitutional sites into the HAp lattice.

3.3. Morphological study of HAp

High-resolution scanning electron microscopy (HR-SEM) and high-resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) were used to study the morphology and crystal size of the synthesized material (HAp-E) and the commercial sample (HAp-C). When synthesizing by precipitation, the formation of nanorods agglomerates is expected, which, when subjected to calcination processes above 700 °C, begin to coalesce, causing the particles to grow. Goloshchapov et al. [25] carried out a process of annealing at 400, 700, and 900 °C observing that particles grow until one micron as temperature increased. Lala et al. [26] synthesized hydroxyapatite from chicken eggshells and explored the effect of aging time on its properties. Although their crystal size calculi using the Scherrer's equation indicated that their hydroxyapatites aged at 12, 24, 36, and 48 h are nanometric (38.71–64.18 nm), crystals coalesced by effect of the calcination at 900 °C, producing micrometric particle agglomeration according with their TEM images. The calcination limit to remain in the nanometric domain is 700 °C, as demonstrated Londoño-Restrepo et al. [8].

Fig. 4(a) and (b) show the HR-SEM images of HAp-E and HAp-C (Sigma Aldrich) taken at 100000 ×, respectively. Fig. 4(c) and (d) show the light field HR-TEM images of HAp-E and HAp-C. The main difference between these HAp is the presence of the minority ions coming from the eggshells and their calcination temperature. These mineral traces could also affect other physicochemical properties of the HAp-E, such as the structural ones.

Comparing the crystal size and shapes of the HAp-E with the commercial sample from Sigma-Aldrich, HAp-C presents elongated morphologies forming flakes in a range of crystal sizes from 25 to 255 nm length (96.90 ± 39.93 nm) and 20–80 nm width (mean: 44.64 ± 12.50 nm). In HAp-E, crystals exhibit irregular morphologies, and diameters range from 10 to 90 nm (mean: 34.40 ± 12.24 nm). In other words, HAp-E is composed of hydroxyapatite nanocrystals. The crystal size distributions are similar and homogeneous to those reported in other works [27]. Although HAp-E was heated at 250 °C to remove reaction by-products, according to Ref. [2], this temperature does not induce physicochemical changes in the crystals as the crystal size transition to

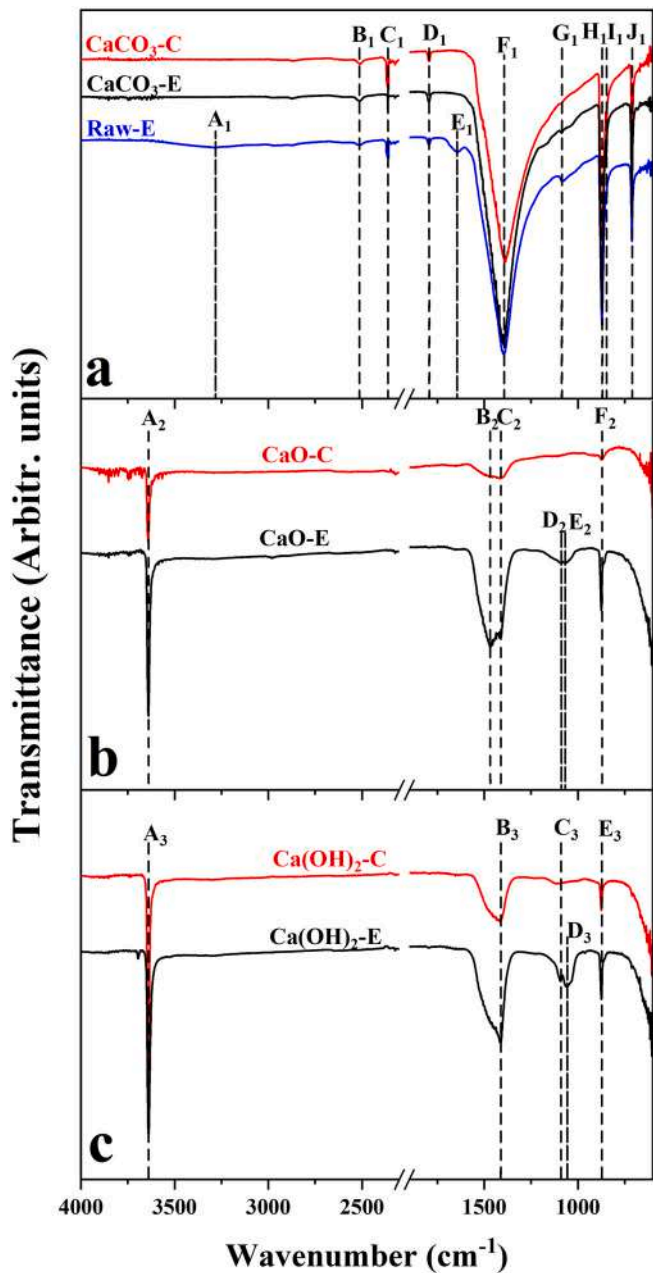


Fig. 8. Infrared spectra of eggshell and commercial samples of (a) CaCO_3 , (b) CaO , and (c) Ca(OH)_2 .

micrometric sizes. For this reason, HAp-E crystals remain nanometric, as can be corroborated in the HR-TEM image (Fig. 4(c)). In HAp-C, calcination above 720°C could have been done based on its crystal size distribution and the elongated morphologies forming flakes of micrometric crystals (Fig. 4(e)).

3.4. Particle size distribution: DLS

Fig. 5 shows particle size distribution for the synthetic hydroxyapatites after aging: HAp-E and HAp-C. Both samples exhibit low polydispersity and monomodal size distribution of microparticles composed of nanocrystals (HAp-E) and microcrystals (HAp-C) according to Fig. 4.

Fig. 5(a) shows that most of the particle size population of HAp-E is between 200 and 700 nm (0.2–0.7 μm) with maximum peaks around 382 nm (0.382 μm). This range is micrometric since crystals have formed cumuli of nanometric crystals (see Fig. 4) after aging. The largest

Table 2

Infrared (FT-IR) band positions for eggshells and commercial samples of CaCO_3 , CaO , and Ca(OH)_2 .

FT-IR Spectroscopy			
Functional group	Wavenumber (cm^{-1}) ^a	Wavenumber (cm^{-1})	Reference
ν (O–H)	(A ₂) 3640	3643	[29]
	(A ₃) 3639	3620	[30]
Amides & Amines	(A ₁) 3282	3288	[30,31]
	ν (O–H)	(B ₁) 2513	2516
N–H (Amides & Amines)	(C ₁) 2361	2360	[31]
	ν (C=O)	(D ₁) 1794	1799
		1798	[33]
		1795	[29]
	C=O (Amides & Amines)	(E ₁) 1645	1652
ν (C–O)	(B ₂) 1468	1459	[32]
	(C ₂) 1411	1417	[33]
Amides & Amines	(B ₃) 1412		[29,30]
	(F ₁) 1396	1385	[30,31]
	ν_s (C–O)	(G ₁) 1086	1083
(D ₂) 1088			
(C ₃) 1091			
C–O	(E ₂) 1054	1064	[34]
	(D ₃) 1056		
	ω (Ca–O)	(H ₁) 870	877, 875, 866
(F ₂) 872		875	[30,31]
(E ₃) 873		874	[33]
C–O	(I ₁) 847	863	[34]
	δ (C–O)	(J ₁) 711	713
		712	[31,32]

^a = This work. ν = stretching, δ = bending, ω = wagging. as = asymmetric, s = symmetric.

population for HAp-C is between 600 and 1250 nm (0.6–1.25 μm), with maximum peaks around 860 nm (0.86 μm) (Fig. 5(b)). This finding reinforces the idea that HAp-C was subjected to a calcination process at high temperature.

3.5. X-ray analysis for lime cycle

Fig. 6(a) shows X-ray diffraction (XRD) patterns of Raw-E, CaCO_3 -E, and CaCO_3 -C indexed as calcium carbonate (Calcite) using the ICDD (International Center for Diffraction Data) card No. 01-083-0577, and silicon dioxide using ICDD card No. 00-083-0539. XRD peaks for Raw-E and CaCO_3 -E exhibit a right shift concerning positions reported in the card. This shift comes from the inclusion of substitutional ions in the calcite lattice. The peak due to the (104) plane is located at 29.4094° in the card, but at 29.4795° for Raw-E and at 29.4372° for CaCO_3 -E. Commercial calcium carbonate does not present a shift because this sample does not contain any additional ions.

Fig. 6(b) shows the XRD patterns of CaO -E and CaO -C indexed using the ICDD card No. 00-037-1497 (CaO ; lime) and the ICDD card No. 00-004-0733 (Ca(OH)_2 ; portlandite). The presence of portlandite in both samples is due to the spontaneous reaction between CaO and water present in the air atmosphere. Again, CaO -E that comes from eggshells exhibits a right shift related to the inclusion of substitutional ions. Fig. 6(c) shows XRD patterns of Ca(OH)_2 -E and Ca(OH)_2 -C (ICDD card No. 00-004-0733) also exhibiting a right shift as happened with CaO .

Fig. 6(d) shows the FWHM for the commercial sample and obtained from eggshells calcium carbonate, calcium oxide, and calcium hydroxide. CaCO_3 -E, CaCO_3 -C, CaO -E, CaO -C, and Ca(OH)_2 -E exhibit close FWHM values among them, while CaCO_3 -C has the highest one, which is associated with longer CaO -water reaction times. Cazalla et al. [28] showed that the crystal size of Ca(OH)_2 aged for 1, 4, and 14 years decreases as the aging time increases.

Fig. 6(e) displays the crystal size calculated for all samples by

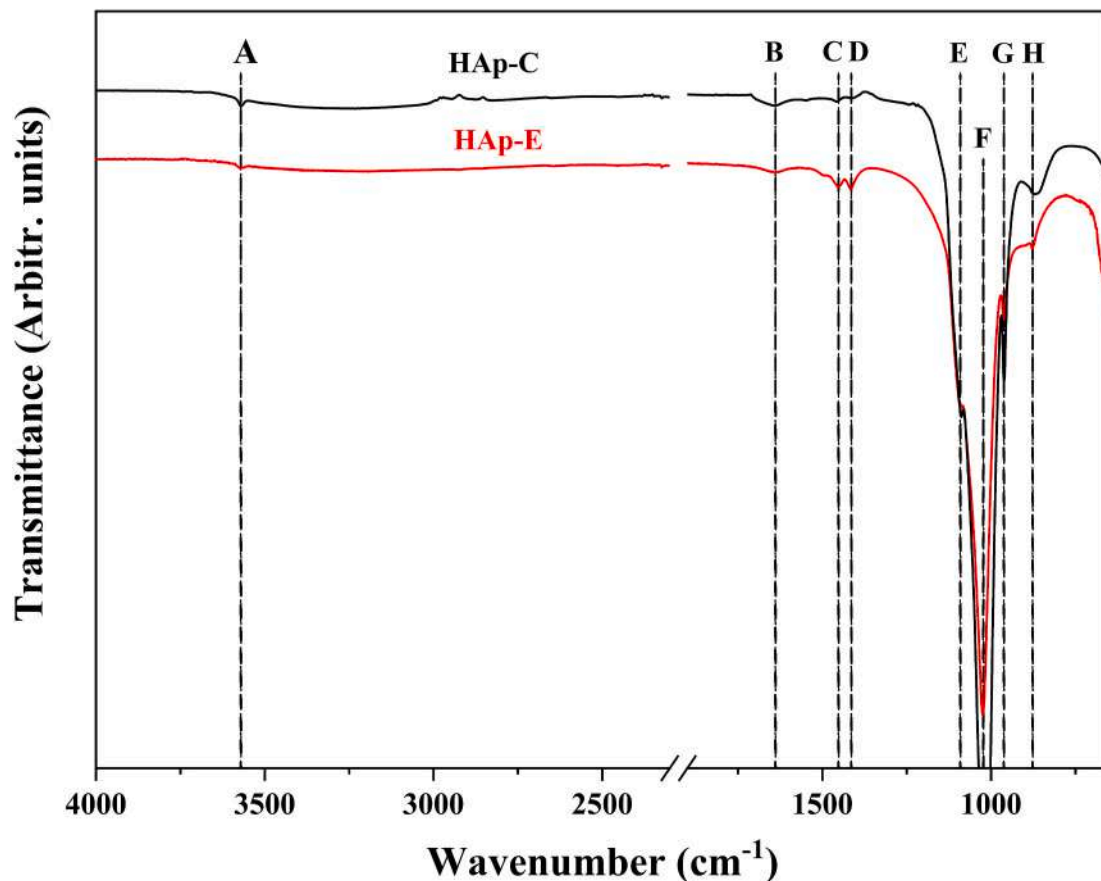


Fig. 9. Infrared spectra of HAp-E and HAp-C.

Table 3
Infrared band positions for HAp-E and HAp-C.

FT-IR Spectroscopy (HAp)			
Functional group	Wavenumber (cm ⁻¹) ^a	Wavenumber (cm ⁻¹)	Reference
ν (COOH)	(A) 3571	3570	[35]
δ (O-H)	(B) 1639	1642	[36]
ν_{3as} (CO ₃ ²⁻)	(C) 1452	1454, 1412	[36,37]
	(D) 1414	1416	[37]
ν_{3as} (PO ₄ ³⁻)	(E) 1091	1088, 1014	[36,37]
	(F) 1023	1023	[37]
ν_{1s} (PO ₄ ³⁻)	(G) 962	962	[37]
		960	[36,37]
ν_{2as} (CO ₃ ²⁻)	(H) 877	873	[37]
		872	[36,37]

^a = This work. ν = stretching, δ = bending, as = asymmetric, s = symmetric.

applying the Scherrer's equation to the diffracted peaks by the (104) plane for CaCO₃, (200) for CaO, and (100) for Ca(OH)₂. According to these calculi, both commercial reagents and the obtained ones from eggshells are nanometric. However, some differences in the values are evident and related to chemical composition, synthesis route, aging, and calcination temperatures.

3.6. X-ray analysis for HAp

Fig. 7(a) shows the HAp-E and HAp-C X-ray patterns indexed with the ICDD card No. 00-009-0432, being hydroxyapatite the only phase. The left shift was also found, as in the case of the lime cycle samples. Lala et al. [20] also found a slight shift in the peak position in the range of 0.1–0.5° that correlated with aging time. However, based on the mineral composition of the synthetic HAp (Table 1), this shift is due to the

presence of these minerals, causing shrinkage of the hydroxyapatite lattice. Rivera et al. [10] and Gergely et al. [13] reported that HAp obtained from eggshells presented other phases as monetite (CaHPO₄) that could be related with no control of the pH during the synthesis. When CaO is obtained, it is hydrated by the environmental water that reacts with the tricalcium phosphate resulting in monetite as an impurity. Goloshchapov et al. [25] reported calcium diphosphate (whitlockite) formation because of the HAp dehydroxylation at 900 °C.

Fig. 7(b) shows the FWHM and the crystal size determination using Scherrer's equation for the (002) plane, confirming the existence of hydroxyapatite nanocrystals. Scherrer's equation allows obtaining an approximation of the crystal size present in the samples. However, it is important to consider that this method was designed for spherical crystals, and hydroxyapatite is a material that presents a compact hexagonal structure. However, the found values agree with the crystal size distribution determined by ImageJ software (see Fig. 4(e)). It is worth noting that Scherrer's equation gives a good approximation of the crystal size in nanometric crystals. Still, simultaneous image analysis is necessary since these techniques do not detect cumuli formation. Differences between the commercial sample and the hydroxyapatite synthesized in this work are due to the synthesis method, calcination temperature, and the presence of the minority ions.

3.7. Vibrational analysis for the eggshells lime cycle

Fig. 8 shows the IR spectra between 4000 and 600 cm⁻¹ for (a) CaCO₃-E and CaCO₃-C, (b) CaO-E and CaO-C, and (c) Ca(OH)₂-E and Ca(OH)₂-C. Letters correspond to the band identification carried out in this work and are compared to others previously reported (Table 2). Bands A₁ (3282 cm⁻¹), C₁ (2361 cm⁻¹), E₁ (1645 cm⁻¹), and F₁ (1396 cm⁻¹) (see Fig. 8(a)) come from organic groups (N-H and C=O) from proteins

and carbohydrates from the raw eggshell membrane.

The A_2 (3640 cm^{-1}) band corresponds to the O–H group environmental water absorption by CaO. In the case of the $\text{Ca}(\text{OH})_2$ samples, A_3 (3639 cm^{-1}) is due to the hydroxyl bond of the alkali. B_1 band (2513 cm^{-1}) is assigned to the presence of the O–H hydroxyl group from water. D_1 (1794 cm^{-1}) corresponds to C=O from carbonate ion (CO_3^{2-}), and the B_2 band (1468 cm^{-1}) is related to C–O bonds, also from carbonates. Both CaO–C and CaO–E are carbonated due to environmental CO_2 at low levels that X-ray diffraction could not detect (see Fig. 6).

Fig. 8(b) and (c) show the C_2 (1411 cm^{-1}), B_3 (1412 cm^{-1}), E_2 (1054 cm^{-1}), D_3 (1056 cm^{-1}), and I_1 (847 cm^{-1}) bands assigned to C–O bonds from carbonates. Finally, H_1 , F_2 , and E_3 bands located around 870 cm^{-1} belong to the Ca–O bond. The J_1 band (711 cm^{-1}) corresponds to C–O bonds associated with out-plane deformations because of the existence of calcium carbonate. The fact that HAp-E is carbonated is not a problem since mammalian hydroxyapatites are carbonated too.

3.8. Vibrational analysis of HAp-E and HAp-C

Fig. 9 shows the IR spectra ($4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$) for HAp-E and HAp-C. Letters correspond to the identification carried out in this work compared with others reported in the literature (Table 3). A band (3571 cm^{-1}) corresponds to the carboxyl group (–COOH) associated with hydroxyapatite due to the interaction of O–H groups with carbonate CO_3^{2-} . The B band (1639 cm^{-1}) is due to the hydroxyl group (O–H) because of water absorbed by the sample. C (1452 cm^{-1}), D (1414 cm^{-1}), and H (877 cm^{-1}) bands are associated with carbonate groups (CO_3^{2-}) because of the carbonation process during the synthesis of hydroxyapatite as they do not have a controlled atmosphere. Meanwhile, bands E (1091 cm^{-1}), F (1023 cm^{-1}), and G (962 cm^{-1}) belong to the phosphate groups (PO_4^{3-}) in both hydroxyapatites.

4. Conclusions

Eggshells can be used as a natural source to obtain nanometric Ca ($\text{OH})_2$ across the lime cycle. Eggshells provided the minority minerals, such as Mg, K, Na, and Zn, at levels close to those reported for hydroxyapatites from human, bovine, and porcine bones. Synthesis conventional methods do not consider their inclusion; thus, it was expected that the commercial sample does not contain them. The nanometric crystal size of the synthesized HAp-E was corroborated by X-ray diffraction and processing of HR-SEM and HR-TEM images. The obtained HAp-E ($10\text{--}90\text{ nm}$) has smaller crystal sizes than the commercial sample ($25\text{--}255\text{ nm}$), whose crystals form micrometric-like-flakes clusters, as seen in the HR-SEM images and corroborated by DLS. This fact is important since it has been demonstrated that nanocrystals promote bone regeneration because of their larger surface area. It means that the HAp-E has the potential to be used in guided bone regeneration. The obtained $\text{Ca}(\text{OH})_2$ from eggshells is an adequate precursor for synthesizing micrometric particles of nano carbonated hydroxyapatite crystals containing the same minority ions as mammalian hydroxyapatites.

CRediT author contribution statement

Omar M. Gomez-Vazquez: Methodology, Formal analysis, Writing – Original draft preparation. Brandon A. Correa-Piña: Methodology, Formal analysis, Writing – Original draft preparation. Luis F. Zubieta-Otero: Investigation, Formal analysis, Writing – Original draft preparation. Angelica M. Castillo-Paz: Investigation, Formal analysis, Writing – Original draft preparation. Sandra M. Londoño-Restrepo: Conceptualization, Supervision, Visualization, Writing – Reviewing and Editing, Supervision. Mario E. Rodríguez-García: Conceptualization, Supervision, Project administration, Writing – Reviewing and Editing.

Declaration of competing interest

The authors declare they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Omar M. Gomez-Vazquez, Brandon A. Correa-Piña Angelica M. Castillo-Paz, and Luis F. Zubieta-Otero want to thank CONACYT-Mexico for the financial support of their postgraduate studies. Sandra M. Londoño-Restrepo thanks CFATA-UNAM for her postdoctoral position. The authors would like to acknowledge Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales (LaNcaM) at the CFATA-UNAM, Dra. Carmen Peza for the technical support of SEM images, and Dra. Beatriz M. Millán-Malo for the technical support of XRD. M. Q. Rosario Espinosa from Anton Paar for the DLS technical support. This project was supported by SEP-CONACYT Ciencia Básica 2018 (A1-S-8979) and Project PAPIIT-UNAM (IN114320). English edition by M.B. Carolina Tavares.

References

- [1] E. O'Neill, G. Awale, L. Daneshmandi, O. Umerah, K.W.H. Lo, The roles of ions on bone regeneration, *Drug Discov. Today* 23 (4) (2018) 879–890, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.049>.
- [2] S.M. Londoño-Restrepo, R. Jeronimo-Cruz, B.M. Millán-Malo, E.M. Rivera-Muñoz, M.E. Rodríguez-García, Effect of the nano crystal size on the X-ray diffraction patterns of biogenic hydroxyapatite from human, bovine, and porcine bones, *Sci. Rep.* 9 (1) (2019) 1–12, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42269-9>.
- [3] S.M. Londoño-Restrepo, R. Jeronimo-Cruz, E. Rubio-Rosas, M.E. Rodríguez-García, The effect of cyclic heat treatment on the physicochemical properties of bio hydroxyapatite from bovine bone, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 29 (5) (2018) 52, <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6061-5>.
- [4] N.A.M. Barakat, M.S. Khil, A.M. Omran, F.A. Sheikh, H.Y. Kim, Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods, *J. Mater. Process. Technol.* 209 (7) (2009) 3408–3415, <https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2008.07.040>.
- [5] C.F. Ramirez-Gutierrez, A.F. Palechor-Ocampo, S.M. Londoño-Restrepo, B. M. Millán-Malo, M.E. Rodríguez-García, Cooling rate effects on thermal, structural, and microstructural properties of bio-hydroxyapatite obtained from bovine bone, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 104 (2) (2016) 339–344, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33401>.
- [6] A.M. Janus, M. Faryna, K. Haberko, A. Rakowska, T. Panz, Chemical and microstructural characterization of natural hydroxyapatite derived from pig bones, *Microchim. Acta* 161 (3) (2008) 349–353, <https://doi.org/10.1007/s00604-007-0864-2>.
- [7] K. Haberko, M.M. Bućko, W. Mozgawa, A. Pyda, J. Brzezińska-Miecznik, J. Carpentier, Behaviour of bone origin hydroxyapatite at elevated temperatures and in O_2 and CO_2 atmospheres, *Ceram. Int.* 35 (6) (2009) 2537–2540, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2009.02.008>.
- [8] S.M. Londoño-Restrepo, B.M. Millán-Malo, A. del Real-López, M.E. Rodríguez-García, In situ study of hydroxyapatite from cattle during a controlled calcination process using HT-XRD, *Mater. Sci. Eng. C* 105 (2019) 110020, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110020>.
- [9] S.C. Wu, H.C. Hsu, S.K. Hsu, Y.C. Chang, W.F. Ho, Synthesis of hydroxyapatite from eggshell powders through ball milling and heat treatment, *J. Asian Ceram. Soc.* 4 (1) (2016) 85–90, <https://doi.org/10.1016/j.jascer.2015.12.002>.
- [10] E.M. Rivera, M. Araiza, W. Brostow, V.M. Castaño, J.R. Díaz-Estrada, R. Hernández, J.R. Rodríguez, Synthesis of hydroxyapatite from eggshells, *Mater. Lett.* 41 (3) (1999) 128–134, [https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(99\)00118-4](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(99)00118-4).
- [11] S.S.A. Abidi, Q. Murtaza, Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction, *J. Mater. Sci. Technol.* 30 (4) (2014) 307–310, <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2013.10.011>.
- [12] P. Wang, C. Li, H. Gong, H. Wang, J. Liu, Morphology control and growth mechanism of magnesium hydroxide nanoparticles via a simple wet precipitation method, *Ceram. Int.* 37 (8) (2011) 3365–3370, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.05.138>.
- [13] G. Gergely, F. Wéber, I. Lukács, A.L. Tóth, Z.E. Horváth, J. Mihály, C. Balázs, Preparation and characterization of hydroxyapatite from eggshell, *Ceram. Int.* 36 (2) (2010) 803–806, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2009.09.020>.
- [14] M. Sadat-Shojai, M.T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomater.* 9 (8) (2013) 7591–7621, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>.
- [15] Y. Dauphin, J.P. Cuif, M. Salomé, J. Susini, C.T. Williams, Microstructure and chemical composition of giant avian eggshells, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (6) (2006) 1761–1771, <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0784-8>.
- [16] M. Galván-Ruiz, R. Velázquez-Castillo, M.A. Pérez-Lara, J.L. Arjona, L. Baños, M. E. Rodríguez-García, Chemical and physical characterization of stuccos from a

- mexican colonial building: el Museo del Calendario de Queretaro, *Archaeometry* 51 (5) (2009) 701–714, <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2008.00456.x>.
- [17] H.K. Kim, H.S. Han, K.S. Lee, D.H. Lee, J.W. Lee, H. Jeon, S.Y. Cho, H.J. Roh, Y. C. Kim, H.K. Seok, Comprehensive study on the roles of released ions from biodegradable Mg-5 wt% Ca-1 wt% Zn alloy in bone regeneration, *J. Tissue Eng. Regen. Med* 11 (2017) 2710–2724, <https://doi.org/10.1002/TERM.2166>.
- [18] R.K. Rude, F.R. Singer, H.E. Gruber, Skeletal and hormonal effects of magnesium deficiency, *J. Am. Coll. Nutr.* 28 (2009) 131–141, <https://doi.org/10.1080/07315724.2009.10719764>.
- [19] R.P. Heaney, Role of dietary sodium in osteoporosis, *J. Am. Coll. Nutr.* 25 (2006), <https://doi.org/10.1080/07315724.2006.10719577>, 271S-276S.
- [20] F. Yang, D. Yang, J. Tu, Q. Zheng, L. Cai, L. Wang, Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling, *Stem Cell*. 29 (2011) 981–991, <https://doi.org/10.1002/stem.646>.
- [21] J. Bejarano, R. Detsch, A.R. Boccaccini, H. Palza, PDLLA scaffolds with Cu- and Zn-doped bioactive glasses having multifunctional properties for bone regeneration, 2016, pp. 1–11, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35952>.
- [22] C.T. Chasapis, A.C. Loutsidou, Zinc and human health: an update, 2012, pp. 521–534, <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0775-1>.
- [23] ASTM F1088–04a, Standard Specification for Beta-Tricalcium Phosphate for Surgical Implantation, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2010, <https://doi.org/10.1520/F1088-04AR10>.
- [24] M.D.L.A. Aguilera-Barreiro, J.A. Rivera-Márquez, H.M. Trujillo-Arriaga, J. A. Tamayo y Orozco, E. Barreira-Mercado, M.E. Rodríguez-García, Intake of dehydrated nopal (*Opuntia ficus indica*) improves bone mineral density and calciuria in adult Mexican women, *Food Nutr. Res.* 57 (1) (2013) 19106, <https://doi.org/10.3402/fnr.v57i0.19106>.
- [25] D.L. Goloshchapov, V.M. Kashkarov, N.A. Rumyantseva, P.V. Seredin, A.S. Lenshin, B.L. Agapov, E.P. Domashevskaya, Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by precipitation using hen's eggshell, *Ceram. Int.* 39 (4) (2013) 4539–4549, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.11.050>.
- [26] S.D. Lala, E. Barua, P. Deb, A.B. Deoghare, Physico-chemical and biological behaviour of eggshell bio-waste derived nano-hydroxyapatite matured at different aging time, *Mater. Today Commun* 27 (2021) 102443, <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102443>.
- [27] W. Luo, Y. Huang, X. Zhou, Q. Han, X. Peng, B. Ren, J. Li, M. Li, L. Cheng, The effect of disaggregated nano-hydroxyapatite on oral biofilm in vitro, *Dent. Mater* 36 (7) (2020) e207–e216, <https://doi.org/10.1016/j.dental.2020.04.005>.
- [28] O. Cazalla, C. Rodríguez-Navarro, E. Sebastian, G. Cultrone, M.J. Torre, Aging of lime putty: effects on traditional lime mortar carbonation, *J. Am. Ceram. Soc.* 83 (5) (2004) 1070–1076, <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.2000.tb01332.x>.
- [29] M. Galván-Ruiz, J. Hernández, L. Baños, J. Noriega-Montes, M.E. Rodríguez-García, Characterization of calcium carbonate, calcium oxide, and calcium hydroxide as starting point to the improvement of lime for their use in construction, *J. Mater. Civ. Eng.* 21 (11) (2009) 694–698, [https://doi.org/10.1061/\(asce\)0899-1561\(2009\)21:11\(694\)](https://doi.org/10.1061/(asce)0899-1561(2009)21:11(694)).
- [30] J. Carvalho, J. Araujo, F. Castro, Alternative low-cost adsorbent for water and wastewater decontamination derived from eggshell waste: an overview, *Waste Biomass Valorization* 2 (2) (2011) 157–167, <https://doi.org/10.1007/s12649-010-9058-y>.
- [31] W.T. Tsai, J.M. Yang, C.W. Lai, Y.H. Cheng, C.C. Lin, C.W. Yeh, Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane, *Bioresour. Technol.* 97 (3) (2006) 488–493, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.050>.
- [32] M.S. Tizo, L.A.V. Blanco, A.C.Q. Cagas, B.R.B. Dela Cruz, J.C. Encoy, J.V. Gunting, R.O. Arazo, V.I.F. Mabayo, Efficiency of calcium carbonate from eggshells as an adsorbent for cadmium removal in aqueous solution, *Sustain. Environ. Res.* 28 (6) (2018) 326–332, <https://doi.org/10.1016/j.serj.2018.09.002>.
- [33] U. Anjaneyulu, S. Sasikumar, Bioactive nanocrystalline wollastonite synthesized by sol-gel combustion method by using eggshell waste as calcium source, *Bull. Mater. Sci.* 37 (2) (2014) 207–212, <https://doi.org/10.1007/s12034-014-0646-5>.
- [34] L. Habte, N. Shiferaw, D. Mulatu, T. Thenepalli, R. Chilakala, J. Ahn, Synthesis of nano-calcium oxide from waste eggshell by sol-gel method, *Sustainability* 11 (11) (2019) 3196, <https://doi.org/10.3390/su11113196>.
- [35] S.M. Londoño-Restrepo, L.F. Zubieta-Otero, R. Jeronimo-Cruz, M.A. Mondragon, M.E. Rodríguez-García, Effect of the crystal size on the infrared and Raman spectra of bio hydroxyapatite of human, bovine, and porcine bones, *J. Raman Spectrosc.* 50 (8) (2019) 1–10, <https://doi.org/10.1002/jrs.5614>.
- [36] L.F. Zubieta-Otero, S.M. Londoño-Restrepo, G. Lopez-Chavez, E. Hernandez-Becerra, M.E. Rodríguez-García, Comparative study of physicochemical properties of bio-hydroxyapatite with commercial samples, *Mater. Chem. Phys.* 259 (2021) 124201, <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.124201>.
- [37] N.A.S. Mohd Pu'ad, J. Alipal, H.Z. Abdullah, M.I. Idris, T.C. Lee, Synthesis of eggshell derived hydroxyapatite via chemical precipitation and calcination method, *Mater. Today Proc.* 42 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.11.276>.

HOSTED BY



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Natural Science: Materials International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pnsmi

Original Research

Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite added with magnesium obtained by wet chemical precipitation

Brandon A. Correa-Piña^a, Omar M. Gomez-Vazquez^a, Sandra M. Londoño-Restrepo^{b,*}, Luis F. Zubieta-Otero^a, Beatriz M. Millan-Malo^b, Mario E. Rodriguez-García^b^a Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, Qro, 76230, Mexico^b Departamento de Nanotecnología, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, Qro, 76230, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Magnesium
Physicochemical properties
Calcination
Nanometric crystal size
Coalescence
Recrystallization

ABSTRACT

Biogenic hydroxyapatites from mammalian bones naturally contain traces of ions, like Mg, which play a vital role in the bone remodeling process. In this way, synthetic hydroxyapatites should include this kind of mineral. In this work, hydroxyapatite added with Mg was synthesized by wet precipitation using $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, and $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0, 0.032, 0.061, and 0.123 M). Inductively coupled plasma and X-ray diffraction evidenced the Mg inclusion in the hydroxyapatite lattice in the same levels reported for natural hydroxyapatites. The calcination at 600 °C was performed to remove the reaction by-products, but it also gave rise to physicochemical changes as the coalescence and crystals recrystallization. It produced, in turn, an improvement in the crystalline quality, according to Raman analysis. Despite those physicochemical changes, all the samples remained nanometric according to scanning electron microscopy imaging.

1. Introduction

Currently, bioceramics are specifically designed for manufacturing surgical implants, prostheses, and artificial organs. They are also used as filling materials to promote bone regeneration. For this purpose, they need to mimic the physicochemical properties of the bone hydroxyapatite (HAP; $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), such as chemical composition, crystal size, and morphology. Recent studies have reported that their physicochemical properties directly depend on the obtaining method [1,2]. In this sense, HAP obtained from mammalian bones has shown significant similarity to human bones in composition, morphology, nanometric crystal size, and crystallinity [3]. However, these properties can be modified during the isolation method since the calcination at elevated temperatures is mostly used to remove the organic matrix (fat, proteins, DNA, soft tissue, etc.). Synthesis of HAP is an alternative way to allow better control of its properties. However, most of them do not have the well-known replacement ions found in mammalian HAP. According to Bose et al. [4], Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Cu^+ , Co^+ , B^{3+} , $\text{Mn}^{2+/3+}$, and Si^{4+} play vital roles in angiogenesis and osteogenesis processes in bone remodeling. The above affirmation does not mean that only HAP from mammalian bones

is suitable as a biomaterial. Instead, it evidences the need for incorporating these ions to emulate the physicochemical properties of the natural bone. One of the advantages of integrating them in a synthetic HAP, as was previously mentioned, is avoiding defatting with contaminant solvents and calcination at high temperatures. This kind of process implies the control of thermal variables such as heating rate [5], sintering temperature [6], sintering time [5,6], cooling rate [6–8], and the atmosphere [9] since the physicochemical properties of HAP are modified by the effect of these parameters [5–8].

Magnesium (Mg) is the second most abundant substitutional ion in the bone and the fourth in the body [10]. About 65% of this mineral is found in bone and teeth. In human, bovine, and porcine bones, Mg concentration has been determined by different quantitative techniques, and inductively coupled plasma (ICP) measures reported that for an adult human bone, the Mg concentration is in the range from 3000 to 6000 ppm [3]. In comparison, other reports using the semi-quantitative method show higher values up to 14000 ppm by X-ray fluorescence [11]. Inductively coupled plasma (ICP) measures reported that for adult human bone, the concentration of Mg ranges from 3000 to 6000 ppm [3], while other reports using the semi-quantitative method show higher

* Corresponding author.

E-mail address: smile2508@comunidad.unam.mx (S.M. Londoño-Restrepo).<https://doi.org/10.1016/j.pnsmi.2021.06.006>

Received 11 December 2020; Received in revised form 5 June 2021; Accepted 9 June 2021

Available online xxx

1002-0071/© 2021 Chinese Materials Research Society. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

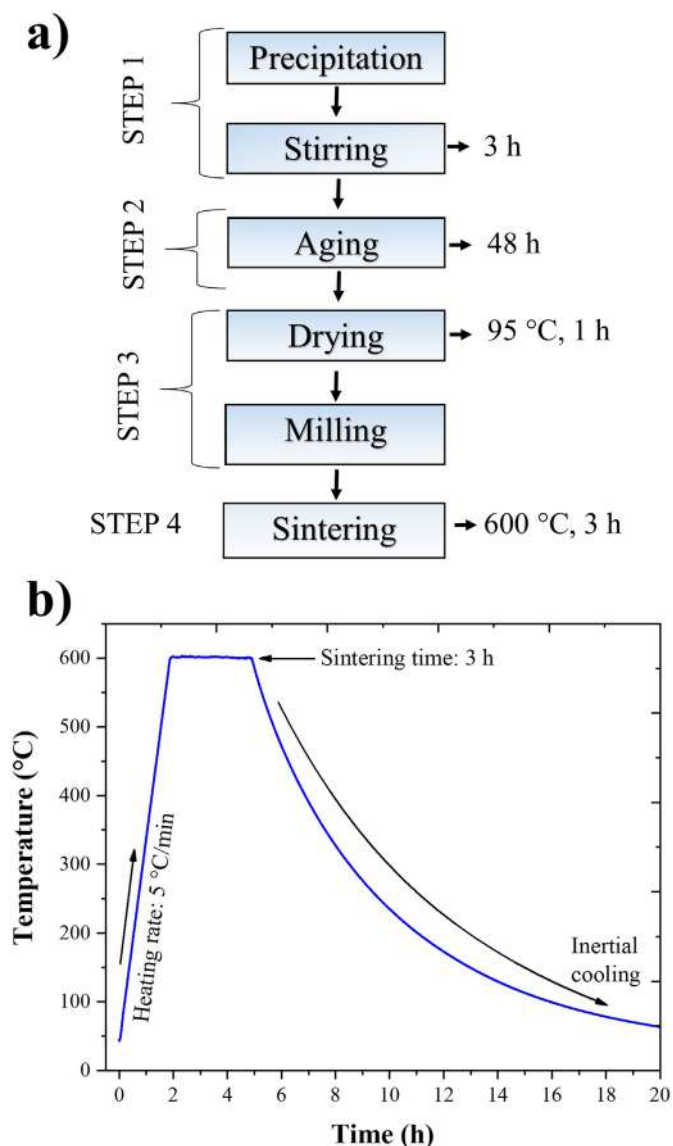


Fig. 1. (a) Block diagram of the process to obtain synthetic HAp; (b) The thermal history for the annealing process in synthetic HAp.

values up to 14000 ppm by X-ray fluorescence [11]. These values indicate that the range of inclusion of Mg must vary from 1000 to 12000 ppm.

Regarding angiogenesis, Mg induces nitric oxide production in endothelial cells that are led to migrate and grow, accelerating new blood vessel formation [12]. Moreover, it has been reported that Mg is involved in the functional maintenance of parathyroid glands and vitamin D metabolism closely related to bone health. Magnesium deficiency has also been linked to osteoporosis, and it has been proved that HAp doped with Mg exhibits more significant osteogenic properties than pure HAp [13,14]. Mg-depletion diets produce a decrease in bone mineral density in rats; meanwhile, high contents of this mineral have been correlated to higher bone mineral density [15]. Moreover, the number and amount of the substitutional elements in bones depend on several factors such as diet, age, and gender [16].

Nagyné-Kovács et al. [17] prepared Mg-substituted HAp samples by the precipitation method with 2 and 4 mol % of Mg/(Ca + Mg). These samples were calcined up to 900 °C for 2 h to improve the crystallinity of the samples. They found that Mg inclusion reduced the lattice parameters and decreased the crystal size as the Mg content increased. Moreover, Mg-HAp doped exhibited an inhibiting effect for Gram-positive and

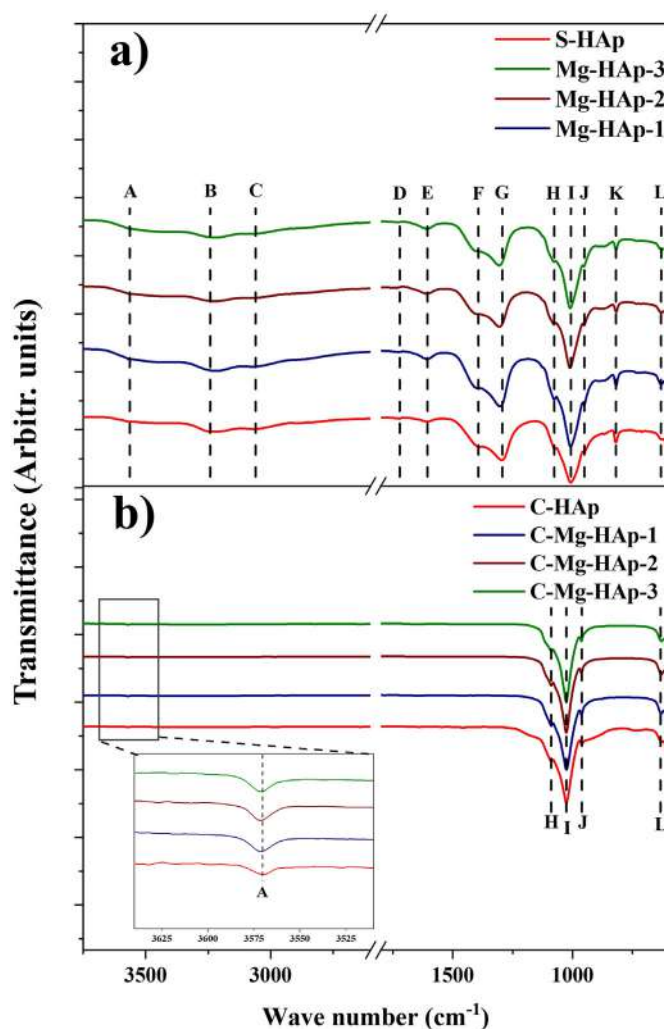


Fig. 2. FT-IR spectra of (a) uncalcined and (b) calcined synthetic samples.

Table 1

Observed infrared band positions for uncalcined and calcined samples.

FTIR bands			
Functional Group	Wavenumber (cm ⁻¹)*	Wavenumber (cm ⁻¹)**	References
ν COOH (HAp)	(A) 3564 ^{ab}	3570	[19–21]
ν_{as} N–H	(B) 3244 ^a	3250	[22]
ν N–H	(C) 3025 ^a	3020	[23]
ν_{1+} , ν_4 NO ₃ ⁻	(D) 1756 ^a	1756	[24]
δ O–H (H ₂ O)	(E) 1637 ^a	1637	[25]
ν_{3as} CO ₃ ²⁻	(F) 1417 ^a	1417,1415	[11,19]
ν_2 NO ₃ ⁻	(G) 1312 ^a	1314	[26]
ν_3 PO ₄ ³⁻	(H) 1088 ^{ab}	1088, 1099	[19,27]
ν_3 PO ₄ ³⁻	(I) 1019 ^{ab}	1014	[19,20]
ν_1 PO ₄ ³⁻	(J) 960 ^{ab}	960, 978	[19,20]
ν_2 NO ₃ ⁻	(K) 827 ^a	831	[24]
ν O–H (H ₂ O)	(L) 630 ^{ab}	632,633	[19,21]

*This work, **Reported positions, a.- Uncalcined samples, b.- Calcined samples, ν - stretching, δ - bending.

negative strains compared to pure Hap. However, according to Londoño-Restrepo et al. [18], incineration of the human bone at 900 °C produced an increase in the crystal size until some microns and a morphology transformation. Thus, the effect of the Mg inclusion cannot be objectively evaluated because of the simultaneous effect of the annealing process.

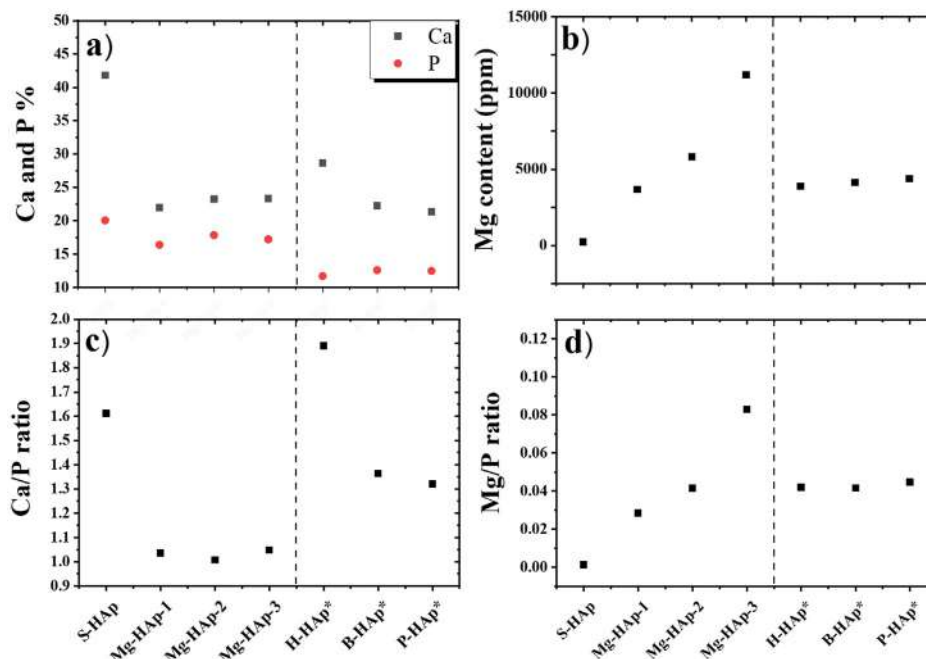


Fig. 3. (a) Ca and P percentage, (b) Mg content, (c) Ca/P ratio, and (d) Mg/P ratio of S-HAp Mg-HAp-1, Mg-HAp-2, Mg-HAp-3. In all cases, the values for human (H-HAp*), bovine (B-HAp*), and porcine (P-HAp*) HAp reported by Londoño-Restrepo et al. [3] are included. *Values reported by Ref. [3].

The objective of this work is to synthesize nano HAp and Mg-HAp using the wet chemical method to study the changes in the morphological, structural, thermal, and vibrational properties of the samples with the Mg inclusion ranging from 4000 to 12000 ppm, as well as these properties change due to the annealing process at 600 °C.

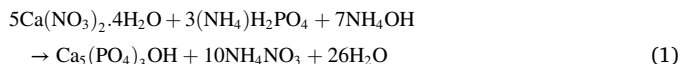
2. Materials and methods

2.1. Synthesis of hydroxyapatite

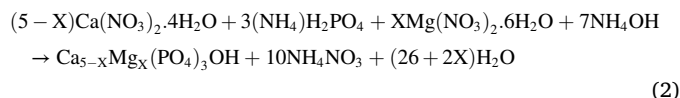
The wet chemical precipitation method was used to synthesize nano HAp following the methodology proposed by Sadat-Shojai et al. [1]. 0.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (99.1%, J.T. Baker, Mexico; code 0776-01) was reacted drop by drop with 1.0 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (99%, Sigma Aldrich, Japan; PCode 1002417639) and $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ACS grade, Golden bell, Mexico; code 26905) 0.032, 0.061, and 0.123 M, respectively to obtain Mg-HAp with Mg levels ranging from 4000 to 12000 ppm in accordance with values reported in the literature. The reaction was kept in stirring and heating at 37.5 °C, and the pH = 9 was controlled by adding NH_4OH (28.0–30.0%, J.T. Baker, USA; code 9721-02) and monitored using an OAKTON (1100 series) pH meter. At the end of the reaction, the product was left for aging treatment for 48 h. Then, the wet powder of Mg-HAp was filtered and dried at 95 °C for 1 h.

The samples with different Mg concentrations were labeled as S-HAp (without Mg), Mg-HAp-1 (0.032 M $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Mg-HAp-2 (0.061 M $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), and Mg-HAp-3 (0.123 M $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), respectively. And then, the samples were calcined at 600 °C and 5 °C/min heating rate for 3 h to remove reaction by-products. The calcined samples were labeled as C-HAp, C-Mg-HAp-1, C-Mg-HAp-2, and C-Mg-HAp-3, respectively.

The reaction for the formation of synthetic HAp is:



The reaction for Mg-HAp formation is:



Where X represents the substitution degree of Mg into the HAp lattice. The block diagram of the process to synthesize HAp is shown in Fig. 1a, and the thermal history for calcination at 600 °C is exhibited in Fig. 1b.

2.2. Functional groups analysis: FTIR analysis

Fourier-Transform Infrared (FTIR) spectroscopy was used to study the vibrational states of S-HAp, Mg-HAp-1, Mg-HAp-2, and Mg-HAp-3, and the calcinated samples: C-HAp, C-Mg-HAp-1, C-Mg-HAp-2, and C-Mg-HAp-3 for monitoring the removal of reaction by-products. The spectra tests were carried out on a PerkinElmer Spectrum Two equipped with an ATR (Attenuated Total Reflectance) accessory with a diamond crystal in the spectral range of 600 to 4000 cm^{-1} at a spectral resolution of 4 cm^{-1} .

2.3. Mineral composition analysis: ICP-OES

The mineral composition of the synthetic uncalcined samples was determined by Inductively Coupled Plasma with Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) using a Thermo Fischer Scientific ICAP 6000 Series equipment with an argon plasma. 0.1 g of each sample was digested with 7 mL of nitric acid (Baker 69.3%); the samples were analyzed in duplicate. Then, the samples were filtered (Whatman No. 42). And finally, the samples were exposed to the argon plasma to excite the elements in the samples to identify them through their characteristic emission.

2.4. Morphological analysis: HR-SEM

Morphological changes of the uncalcined and calcined samples as a function of the Mg added were studied by High-Resolution Scanning Electron Microscopy (HR-SEM) using a Hitachi SU8230 (Hitachi High-Technologies, Rexdale, ON, Canada) cold-field emission scanning electron microscope (CFE-SEM) at a low accelerating voltage (3 keV).

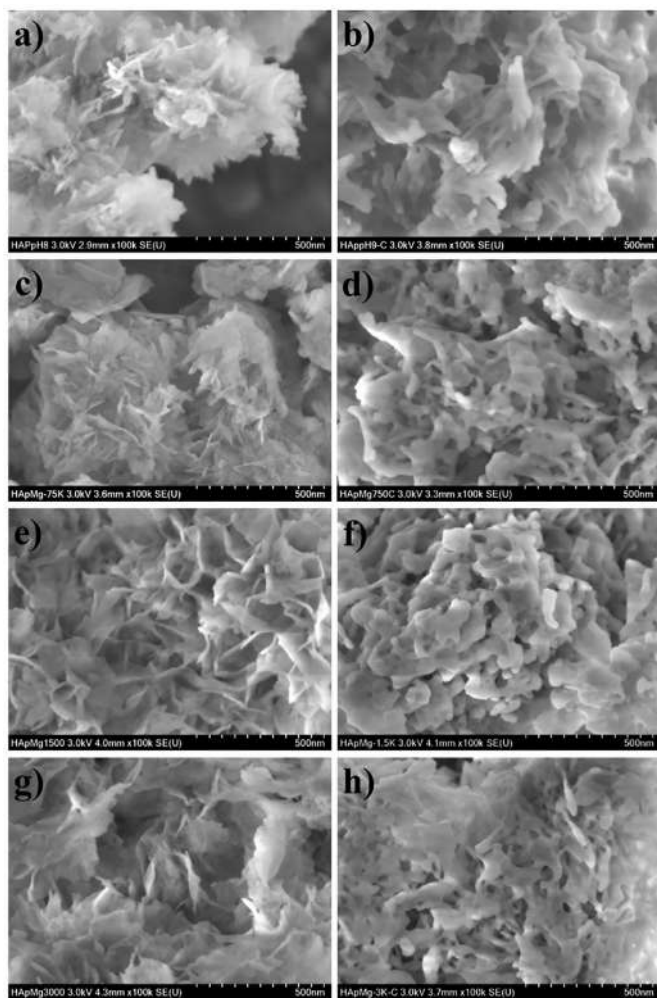


Fig. 4. SEM images of (a) S-HAp; (b) C-HAp; (c) Mg-HAp-1; (d) C-Mg-HAp-1; (e) Mg-HAp-2; (f) C-Mg-HAp-2; (g) Mg-HAp-3; (h) C-Mg-HAp-3.

2.5. Phase structure analysis: X-ray diffraction (XRD)

XRD was used to determine the crystalline phases and changes in the full width at the half maximum (FWHM) of uncalcined and calcined samples due to the Mg inclusion. The samples were packed in an Aluminum holder. A Rigaku Ultima IV diffractometer operating at 40 kV, 30 mA with a $\text{CuK}\alpha$ radiation wavelength of $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ was used. Diffractograms were taken from 5 to 80° in a 2θ scale and 0.02° step size.

$$D_{\text{Scherrer}} = \frac{K \lambda}{\beta_T \cos \theta} \quad (3)$$

The crystallite size calculation was first performed using the Scherrer equation (D_{Scherrer}) Eq. (3). In Eq. (3), D_{Scherrer} is the crystallite size (nm), β_T is the FWHM for the (002) plane, K is the shape factor (0.9), $\lambda = 0.15406 \text{ \AA}$ is the wavelength of $\text{CuK}\alpha$ radiation, and θ is the angle in degrees in radians.

2.6. Thermal analysis: DSC

Thermal measurement of S-HAp, Mg-HAp-2, and Mg-HAp-3 was carried out in a Differential Scanning Calorimeter (DSC) 2 Star^e system from Mettler Toledo. The sample of $9.0 \pm 0.5 \text{ mg}$ was put into an alumina crucible and heated from 50 to 650°C at a heating rate of $5^\circ\text{C}/\text{min}$.

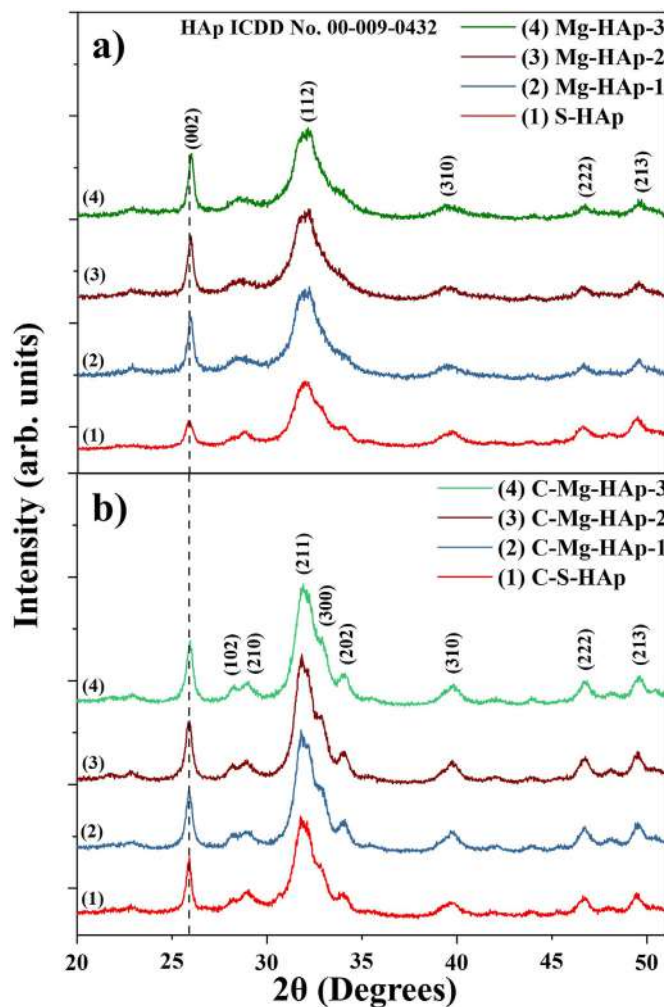


Fig. 5. X-ray diffraction patterns of (a) uncalcined; (b) calcined samples.

2.7. Raman spectroscopy

The samples of S-HAp, C-HAp (without Mg addition), and Mg-HAp and C-Mg-HAp series (with Mg addition) under the conditions of before and after calcination were analyzed using a Senterra Raman spectrometer from Bruker, equipped with a 785 nm laser and an Olympus microscope. A $20\times$ objective was used. The spectral range measured was from 940 to 980 cm^{-1} , with a resolution of 3 cm^{-1} . The instrument parameters were a $50 \mu\text{m}$ aperture, 100 mW of laser power, 6 s integration time, and six scans.

3. Results and discussion

3.1. Reaction by-products removal

Synthetic hydroxyapatites were firstly characterized by FTIR (Fig. 2a). These spectra confirmed the presence of hydroxyapatite in all uncalcined samples; however, they also had bands of nitrate (B, C, D, G, and K bands) and carbonate (F) functional groups as reaction by-products. Functional groups originating these vibrations were assigned to each band and their positions reported in Table 1 together with positions listed in the literature. For this reason, S-HAp, Mg-HAp-1, Mg-HAp-2, and Mg-HAp-3 were calcined at 600°C . This temperature was enough to remove these additional compounds, as shown in Fig. 2b, in which the bands are just for hydroxyapatite (A, H, I, J, and L) to present.

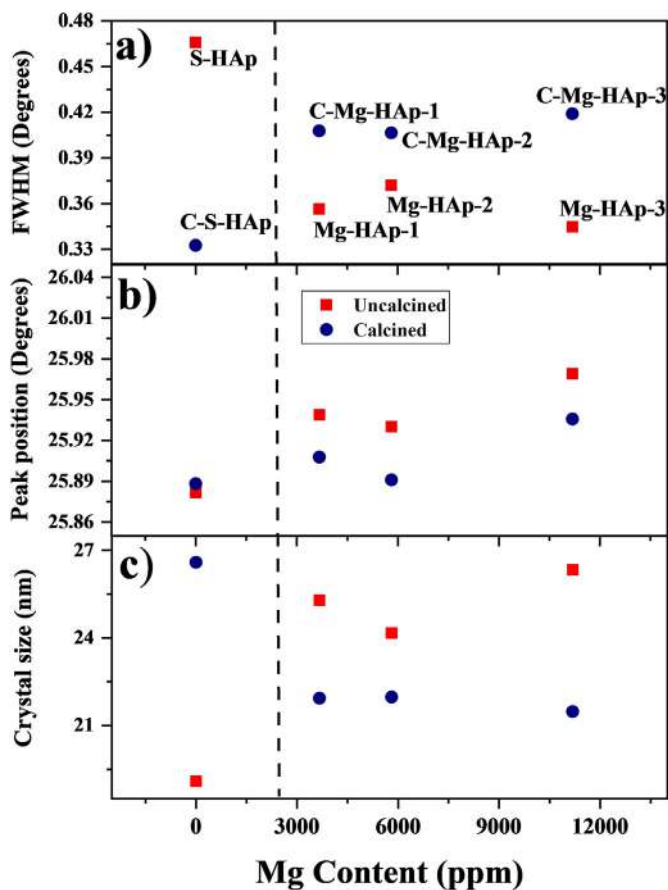


Fig. 6. (a) Changes in the FWHM of the (002) plane; (b) Changes in the peak position for (002) plane; (c) Changes in the crystal size for samples with different Mg concentrations.

3.2. Effect of the Mg-adding on the Ca/P ratio

Fig. 3a shows the Ca and P contents for the uncalcined synthetic samples; S-HAp: 41.92 and 20.11%; Mg-HAp-1: 21.90 and 16.38%; Mg-HAp-2: 23.31 and 17.93%; and Mg-HAp-3: 23.45 and 17.29%, respectively. HAp samples added with Mg exhibited lower Ca and P percentages regarding S-HAp, which is directly related to the Mg inclusion in the HAp lattice in Ca sites and the presence of chemical reaction by-products. Theoretically, pure hydroxyapatite has 38.89% Ca and 18.49% P. However, human (H-HAp), bovine (B-HAp), and porcine (P-HAp) hydroxyapatites exhibit lower values than pure synthetic HAp [3]. Hydroxyapatites added with Mg present Ca and P levels similar to mammalian hydroxyapatites and the theoretical values. Fig. 3b exhibits the Mg content (ppm) for each uncalcined synthetic sample, in which an increasing linear trend was found as expected based on the Mg concentrations used. It is worth noting that Mg levels are between 3626 and 11205 ppm. In other words, HAp was synthesized with Mg within the reported values for mammalian hydroxyapatites. Mg-HAp-1 exhibits the closest Mg content to the samples reported by Londoño-Restrepo et al. [3].

Fig. 3c also displays the Ca/P ratio decreased after Mg adding as a consequence of its inclusion. Ca/P ratio for pure stoichiometric hydroxyapatite is 1.67, but 1.61 for S-HAp, which could be affected by the presence of the by-products reported in IR spectra. In the same way, Mg-HAp-1, Mg-HAp-2, and Mg-HAp-3 have even a lower Ca/P ratio than S-HAp because $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ produced additional by-products according to reaction (2). This fact is just a concentration effect that is improved after calcination. Fig. 3d shows the Mg/P ratio, and again, the linear trend confirms the inclusion of the Mg as expected. The Mg/P ratio

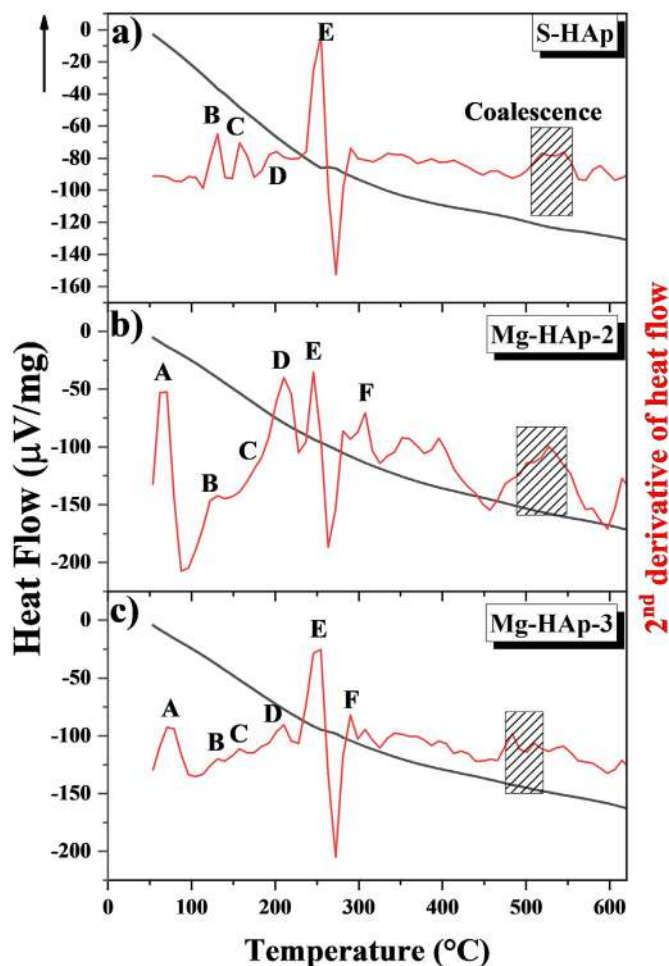


Fig. 7. DSC thermograms for (a) S-HAp; (b) Mg-HAp-2; (c) Mg-HAp-3.

exhibits an increase because of the increase in Mg concentration.

3.3. Effect of the Mg-adding and calcination on the morphology

Fig. 4a (S-HAp), c (Mg-HAp-1), e (Mg-HAp-2), and g (Mg-HAp-3) show the HR-SEM images of the uncalcined hydroxyapatites. Uncalcined samples exhibited highly dense flower-like structures that disappeared after calcination at 600 °C (see Fig. 4b, d, f, and h). The presence of these flakes is due to the reaction by-products that were removed by calcination according to Fig. 2. Fig. 4b, d, f, and h show nanometric crystals whose morphology was affected by the presence of Mg but also by the incineration temperature. Londoño-Restrepo et al. [18] reported that during calcination (400 to 900 °C) of HAp crystals obtained from bovine bones, the crystal size increases from nano to micro. However, before that transition occurred, a coalescence phenomenon happened when crystals were still nanometric until 700 °C. When S-HAp, Mg-HAp-1, Mg-HAp-2, and Mg-HAp-3 are calcined at 600 °C, the particle size increased, the flakes forming flowers disappeared, and the samples become interconnected networks of coalesced nanocrystals that increased their size as the Mg concentration increased.

According to Fig. 4, the incorporation of at least 11000 ppm Mg in the HAp lattice affects the morphology and the crystal size of the samples. Mg-HAp-1 and Mg-HAp-2 formulations after calcination produce interconnected networks composed of nanocrystals that look like natural HAp from mammalian bones [3]. Mg-HAp-3 crystals coalesced, forming dense microparticles that are not recommended for clinical applications.

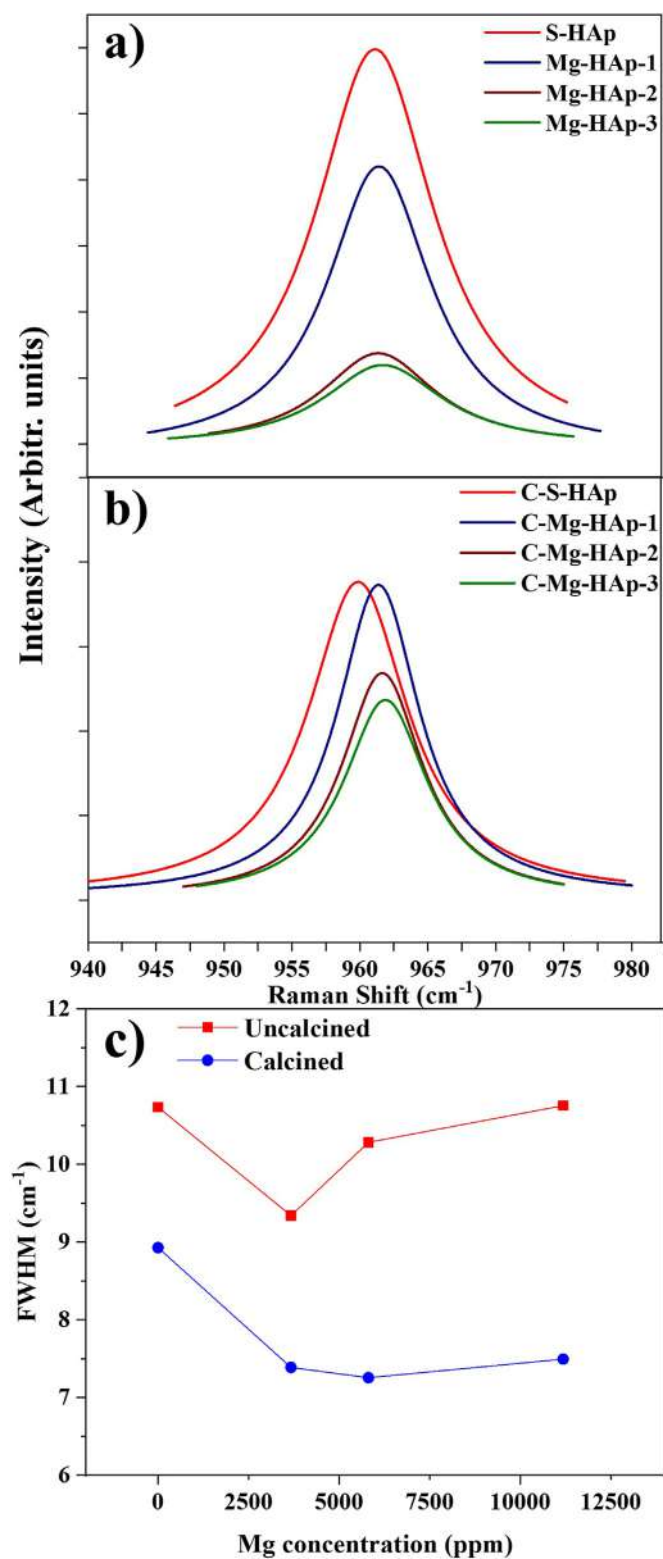


Fig. 8. Raman spectra for (a) uncalcined; (b) calcined synthetic samples; (c) FWHM of the Raman shift in 960 cm^{-1} .

3.4. Crystalline phase determining

One of the main problems associated with incorporating any ion into a specific lattice is determining its site. In the case of iso-valent ions, it is

expected that these ions occupy substitutional places, as is the case of Mg in Ca sites. However, extrinsic factors such as the growth method, temperature, and treatments, can modify the substitutional site and locate it as an interstitial atom. One of the most used techniques to determine the inclusion of an ion into a lattice is X-ray diffraction because it entails radii changes that affect the crystal parameter [28]. The contraction of the HAp unit cell dimensions due to the Mg incorporation in Ca sites is expected since the ionic radius of Ca^{2+} is 0.99 \AA , while 0.72 \AA for Mg^{2+} .

Fig. 5a shows XRD patterns for the uncalcined synthetic hydroxyapatites that exhibit broad peaks indexed using the ICDD card No. 00-009-0432 for hydroxyapatite. The peak located at 25.879° , corresponding to the (002) plane, is slightly shifted to the right, indicating a reduction of the lattice parameters. This shift indicates, in turn, the inclusion of Mg in Ca-sites because of their same valency. The decrease in the lattice size is due to the smaller atomic radius of Mg than for Ca. Fig. 5b shows the patterns for the samples calcined at 600°C . Emerging diffracted planes such as (102), (210), (300), and (202) are evidence of recrystallization happening at this temperature. Remarkably, the crystal size did not suffer significant changes, remaining in the nano-size domain; thus, peaks kept wide. The recrystallization was produced by the sintering time under quasi-steady-state conditions for 3 h [13].

3.5. Crystalline quality and crystal size of Mg-added hydroxyapatites

One of the most used methods to study the changes in the structure, crystalline quality, and crystal size of a sample is the analysis of the full width at the half maximum (FWHM) of a single peak. In the case of microcrystals, a reduction of the FWHM is indicative of crystalline quality improvement. According to Londoño-Restrepo et al. [3], for nanocrystals, broad peaks (high FWHM) are originated by simultaneous elastic and inelastic scattering instead of low crystalline quality. Fig. 6a shows the FWHM for the peak corresponding to the (002) plane for uncalcined (red squares) and incinerated HAp samples (blue circles) as a function of the Mg content (Fig. 3b). FWHM of the synthetic hydroxyapatite without Mg decreased after calcination due to a crystallinity improvement while the crystal size increased (see Fig. 4a and b).

On the other hand, the addition of Mg caused FWHM to decrease due to obtaining larger crystallites, as shown in Fig. 4. The decrease after adding Mg should not be interpreted as a crystal quality improvement since S-HAp exhibited a pattern with more defined peaks than Mg-added hydroxyapatites (see Fig. 5a). Mg-HAps suffered a combined effect of recrystallization (see Fig. 5), and the removal of by-products (see Fig. 4) is reflected in the increase of their FWHM values after calcining.

Fig. 6b shows the peak position for calcined and uncalcined samples for the (002) plane as a function of the Mg concentration. A right shift regarding a sample without Mg was present, indicating a reduction of the hydroxyapatite lattice. In turn, it indicates that there was a divalent replacement in which Mg, with a smaller radius, occupied Ca sites. Fig. 6c shows the calculi of the crystal size obtained using Scherrer's equation. According to this figure, the crystal size of S-HAp decreased after calcination. From a physics point of view, this asseveration must be described in detail. It is necessary to consider that the Scherrer's equation does not consider the crystalline quality and combined effects as those in the studied samples after calcination. The recrystallization produced a decrease of the FWHM that does not imply changes in the crystal size. In the case of Mg-added hydroxyapatites, the crystals grew due to the coalescence phenomenon.

3.6. Thermal events during calcination of Mg-added hydroxyapatites

Fig. 7 shows the DSC thermograms and their second derivative for (a) S-HAp, (b) Mg-HAp-2, and (c) Mg-HAp-3 from room temperature to 650°C . These curves show the endothermic and exothermic events to take

place because of the heating process. The arrow in this figure shows the exothermal events. The second derivative was obtained to identify the better temperature at which these thermal events occurred.

Six endothermal events were identified and labeled from A to F in Fig. 7. Peak A, located at 67 °C is due to the loss of surface water of the nitrates. Likewise, peak B (130.8 °C) is attributed to the loss of lattice water. Peak C (156 °C) corresponds to the ammonium nitrate phase shift from the orthorhombic to the cubic crystalline system [29]. The thermal event of peak D (207 °C) belongs to the dissociation of NO₂ related to the Mg and Ca precursors of the reactions [30]. Peak E (290 °C) corresponds to the ammonium nitrate decomposition [31], and peak F (305 °C) is attributed to the decomposition of magnesium nitrate that did not react [32]. The shaded zone located between 507 and 557 °C corresponds to the first coalescence of the hydroxyapatite crystals in which they remain nanometric, according to Fig. 4. Peak H (626 °C) is related to a recrystallization process reported earlier by Londoño-Restrepo et al. [3]. Peak G (Fig. 7a, b, and c) located at 610 °C corresponds to the melting point of calcium nitrate [33]. Based on this information, calcining the samples at 600 °C involves coalescence and recrystallization, as observed in Figs. 4–6.

3.7. Crystalline quality analysis by Raman spectroscopy

Fig. 8a and b show the PO₄³⁻ band for the uncalcined and calcined samples. This band located around 960 cm⁻¹ is characteristic of HAp and has been used to indicate the quality of the samples. For the uncalcined samples, the intensity of this band decreased as the concentration of Mg increased. Remembering that uncalcined samples contained NH₄NO₃, and thus, this decrease was just a concentration effect. After calcination, by-products were removed from the HAp; then, this concentration-effect, as mentioned earlier, disappeared. For Raman and X-ray diffraction, low FWHM values can be related to high crystalline quality and large crystal size. Knowing that both sets of the samples were nanometric, the findings were entirely due to the quality of the HAp crystals. Fig. 8c shows that the calcined samples improved their quality as the Mg content increased, the sample with the highest Mg content being the best. This result is in accordance with SEM images, in which an interconnected network of faceted nanocrystals was observed, based on the X-ray diffraction patterns.

4. Conclusions

The wet chemical method allows synthesizing nanometric hydroxyapatite with Mg inclusion in its lattice. Although the calcination at 600 °C is required to remove the non-reacted by-products, this temperature does not change the crystal size significantly. ICP results show that the Mg content this technique is between 3600 and 11200 ppm, emulating the Mg concentration in human bone. Nevertheless, including at least 11000 ppm Mg in the HAp lattice affects the morphology and the crystal size of HAp. For this reason, it is recommended that the addition of Mg should be between 3600 and 5800 ppm. X-ray diffraction analysis shows that HAp recrystallization produces a decrease in the FWHM that does not imply crystal size change. During the calcination at 600 °C, the recrystallization and coalescence phenomena produce the changes in the morphological and structure properties of the HAp, which is confirmed by DSC and Raman spectroscopy.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Brandon A. Correa-Piña, Omar Gomez-Vazquez, and Luis F. Zubieta-Otero want to thank CONACYT-Mexico for the financial support of their postgraduate studies. Sandra M. Londoño-Restrepo thanks CFATA-UNAM for her postdoctoral position. Authors would like to acknowledge Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales (LaNCaM) at the CFATA-UNAM, México, and M. en I.Q. Alicia del Real López for the technical support of SEM images. This project was supported by SEP-CONACYT Ciencia Básica 2018 (A1-S-8979) and Project PAPIIT-UNAM (IN114320). English Edition by Silvia Stroet.

References

- [1] M. Sadat-Shojai, M.T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, *Acta Biomater.* 9 (2013) 7591–7621, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>.
- [2] S.L. Bee, Z.A.A. Hamid, *Ceram. Int.* 46 (2020) 17149–17175, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.04.103>.
- [3] S.M. Londoño-Restrepo, R. Jeronimo-Cruz, B.M. Millán-Malo, E.M. Rivera-Muñoz, M.E. Rodríguez-García, *Sci. Rep.* 9 (2019) 5915, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42269-9>.
- [4] S. Bose, G. Fielding, S. Tarafder, A. Bandyopadhyay, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 594–605, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.06.005>.
- [5] S.M. Londoño-Restrepo, R. Jeronimo-Cruz, E. Rubio-Rosas, M.E. Rodríguez-García, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 29 (52) (2018) 1–15, <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6061-1>.
- [6] S.M. Londoño-Restrepo, C.F. Ramirez-Gutierrez, A. del Real, E. Rubio-Rosas, M.E. Rodríguez-García, *J. Mater. Sci.* 51 (2016) 4431–4441, <https://doi.org/10.1007/s10853-016-9755-4>.
- [7] C.F. Ramirez-Gutierrez, A.F. Palechor-Ocampo, S.M. Londoño-Restrepo, B.M. Millán-Malo, M.E. Rodríguez-García, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 104 (2016) 339–344, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33401>.
- [8] C.F. Ramirez-Gutierrez, S.M. Londoño-Restrepo, A. del Real, M.A. Mondragón, M.E. Rodríguez-García, *Ceram. Int.* 43 (2017) 7552–7559, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.03.046>.
- [9] A.M. Janus, M. Faryna, K. Haberko, A. Rakowska, T. Panz, *Microchim Acta* 161 (2008) 349–353, <https://doi.org/10.1007/s00604-007-0864-2>.
- [10] F.I. Wolf, A. Cittadini, *Mol. Aspect. Med.* 24 (2003) 3–9, [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(02\)00087-0](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(02)00087-0).
- [11] M.E. Bahrololoom, M. Javidi, S. Javadpour, J. Ma, *J. Ceram. Process. Res.* 10 (2009) 129–138.
- [12] J.A.M. Maier, D. Bernardini, Y. Rayssiguier, A. Mazur, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Mol. Basis Dis.* 1689 (1) (2004) 6–12, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.02.004>.
- [13] E. Landi, G. Logroscino, L. Proietti, A. Tampieri, M. Sandri, S. Sprio, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (2008) 239–247, <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0032-y>.
- [14] S. Castiglioni, A. Cazzaniga, W. Albisetti, J.A.M. Maier, *Nutrients* 5 (2013) 3022–3033, <https://doi.org/10.3390/nu5083022>.
- [15] L.A. Martini, J. Mayer, *Nutr. Rev.* 57 (2009) 227–229, <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1999.tb06948.x>.
- [16] M. de los A. Aguilera-Barreiro, K.F. Dávalos-Vázquez, C. Jiménez-Méndez, D. Jiménez-Mendoza, L.A. Olivarez-Padrón, M.E. Rodríguez-García, *Nutr. Hosp.* 29 (2014) 1419–1426, <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.6.7382>.
- [17] T. Nagyné-Kovács, L. Studnicka, A. Kincses, G. Spengler, M. Molnár, M. Tolner, I.E. Lukács, I.M. Szilágyi, G. Pokol, *Ceram. Int.* 44 (2018) 22976–22982, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.09.096>.
- [18] S.M. Londoño-Restrepo, B.M. Millán-Malo, A. del Real-López, M.E. Rodríguez-García, *Mater. Sci. Eng. C* 105 (2019) 110020, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110020>.
- [19] S.M. Londoño-Restrepo, L.F. Zubieta-Otero, R. Jeronimo-Cruz, M.A. Mondragon, M.E. Rodríguez-García, *J. Raman Spectrosc.* 50 (8) (2019) 1120–1129, <https://doi.org/10.1002/jrs.5614>.
- [20] A.A. Shaltout, M.A. Allam, M.A. Moharram, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 83 (2011) 56–60, <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2011.07.036>.
- [21] M.H. Kebiroglu, C. Orek, N. Bulut, O. Kaygili, S. Keser, T. Ates, *Ceram. Int.* 43 (2017) 15899–15904, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.08.164>.
- [22] S.S. Yang, Z.B. Chen, in: *Procedia Eng.*, Elsevier Ltd, 2018, pp. 906–910, <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.12.091>.
- [23] H. Kubota, C. Liu, T. Toyao, Z. Maeno, M. Ogura, N. Nakazawa, S. Inagaki, Y. Kubota, K.I. Shimizu, *ACS Catal.* 10 (2020) 2334–2344, <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b05151>.
- [24] H.B. Wu, M.N. Chan, C.K. Chan, *Aerosol Sci. Technol.* 41 (2007) 581–588, <https://doi.org/10.1080/02786820701272038>.
- [25] S. Martínez, F. Acción, F. Puertas, *Mater. Construcción* 42 (1992) 25–36, <https://doi.org/10.3989/mc.1992.v42.i227.704>.
- [26] N. Vollmer, R. Ayers, *Int. J. Self-Propag. High-Temp. Synth.* 21 (2012) 189–201, <https://doi.org/10.3103/S1061386212040073>.

- [27] S. Tavakol, M.R. Nikpour, A. Amani, M. Soltani, S.M. Rabiee, S.M. Rezayat, P. Chen, M. Jahanshahi, J. Nanoparticle Res. 15 (2013) 1373, <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1373-8>.
- [28] M.E. Rodríguez, A. Gutiérrez, O. Zelaya-Angel, C. Vázquez, J. Giraldo, J. Cryst. Growth 233 (2001) 275–281, [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(01\)01530-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(01)01530-5).
- [29] S. Chaturvedi, P.N. Dave, J. Energetic Mater. 31 (2013) 1–26, <https://doi.org/10.1080/07370652.2011.573523>.
- [30] L.F. Lozano, M.A. Peña-Rico, A. Heredia, J. Ocotlán-Flores, A. Gómez-Cortés, R. Velázquez, I.A. Belío, L. Bucio, J. Mater. Sci. 38 (2003) 4777–4782, <https://doi.org/10.1023/A:1027483220584>.
- [31] R. Gunawan, S. Freij, D. Zhang, F. Beach, M. Littlefair, Chem. Eng. Sci. 61 (2006) 5781–5790, <https://doi.org/10.1016/j.ces.2006.04.044>.
- [32] J. Mu, D.D. Perlmutter, Thermochim. Acta 56 (1982) 253–260, [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(82\)87033-0](https://doi.org/10.1016/0040-6031(82)87033-0).
- [33] C. Ettarh, A.K. Galwey, Thermochim. Acta 288 (1996) 203–219, [https://doi.org/10.1016/s0040-6031\(96\)03052-3](https://doi.org/10.1016/s0040-6031(96)03052-3).