



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE FÍSICA

***SÍNTESIS DE NANOFLAKES DE HIDROXIAPATITA A TEMPERATURA
AMBIENTE, PARA SU APLICACIÓN COMO COMPOSITO CERÁMICO***

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

PRESENTA:
M en C. Maricela Santana Vázquez

Tutor Principal
Dr. Raúl Herrera Becerra
Instituto de Física

Comité Tutor
Dra. Cristina Piña Barba
Instituto de Investigaciones en Materiales

Dr. José Reyes Gasga
Instituto de Física

Ciudad Universitaria, CDMX, Noviembre 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis la dedico especialmente a la memoria de mí
Muy amado padre José Alfredo Santana García (†),
Por todos los esfuerzos que hizo por mí desde mi infancia,
Por la gran confianza que depositó en mí y por todos los recuerdos

Que guardo de él.

A la mujer por la que soy, mi hermosa mamá

a quien admiro su fortaleza

De mujer y porque en gran parte

Gracias a ti pude llegar hasta este momento

Tan importante de mi formación profesional.

A mis adorables hermanas Jessica Areli y Karen Arlet

Gracias por siempre apoyarme, por estar conmigo en los
momentos más difíciles y

por haberme brindado su comprensión cuando lo necesité.

A mi bella hija Emily Elaine mi mayor motivación

que gracias a su presencia siempre dije esto sale por que sale

Y que gracias a su compañía puedo reír a carcajadas

al verla sonreír

AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios Universidad Nacional Autónoma de México, que me dio todo y abrió sus puertas del conocimiento desde el nivel medio superior. Agradezco al Instituto de Investigación en Materiales y al Instituto de Física.

Mi más sensible y humilde agradecimiento a mi tutor académico, Dr. Raúl Herrera Becerra, por facilitarme todos los medios para realizar este trabajo de investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua y quien sin duda alguna, me ayudó a crecer como persona a través de ciertas situaciones y a nunca darme por vencida.

Agradezco el apoyo técnico brindado por la Ing. Cristina Zorrilla Cangas, gracias por la disponibilidad y enseñarme el manejo del equipo Raman y por su valiosa amistad.

Al personal del posgrado IIM en especial a Esther Carrillo, Diana e Isabel.

Agradezco al Dr. Carlos Magaña, al M en C. Salvador Solórzano al Fis. Roberto Reyes y Antonio Espino por todo el apoyo técnico que me brindaron.

Me encantaría que estas líneas sirvieran para expresar mi profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado a lo largo de mis estudios de Doctorado, al Dr. J. Octavio Estévez, Dra. Lourdes Bazán, Dr. Francisco Asencio Aguirre y al Dr. Rubén Mendoza.

Muchas gracias al equipo de trabajo del Dr. Higinio Arzate jefe del laboratorio de biología periodontal UNAM entre ellos; M en C. Sonia López Letayf, Dra. Fabiola Salgado Chavarría, Dra. Lia Hoz Rodríguez, Dr. Nahum Salmeron y M en C. Rodrigo Correa Prado.

Agradezco a mi comité tutor: Dr. José Reyes Gasga y Dra. Ma. Cristina Piña Barba por su tiempo y dedicación.

Mi gratitud a mis compañeros y amigos del laboratorio y posgrado, M.C Pedro Perdigón Lagunés, Dra. Adriana Báez por haber compartido esta etapa en nuestras vidas y por todo lo que he aprendido de ustedes.

Un especial agradecimiento al Consejo de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado.

INDICE DE CONTENIDOS

	Pags.
INTRODUCCIÓN	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
Objetivo	
Metas	10
1. Antecedentes	14
2. Metodología.....	21
2.1 Obtención de HA... ..	22
2.2 Obtención de compósitos.....	26
2.3 Sustrato de Silicio Poroso obtenido de una planta endémica	27
2.4 Fabricación de andamios Péptido@Hidroxiapatita.....	28
2.5 Caracterización.....	30
3. Resultados	32
3.1 Obtención de HAP.....	32
3.2 Compósitos de HA@PS-n y HA@PS-p.....	38
3.3 Compósito de HA y Sustratos de Silicio poroso obtenido de una planta endémica....	44
3.4 Compósito Péptido@Hidroxiapatita	48
4. Análisis de Resultados	53
5. Conclusiones.....	62
 BIBLIOGRAFÍA.....	 65

Resumen

En este trabajo, se realizó un procedimiento simple y de bajo costo para sintetizar nanoestructuras de hidroxiapatita, usando un método de coprecipitación con ácido tánico como agente estabilizante a temperatura ambiente y secado por congelación. Como resultado, se obtuvo el material en polvo. Las muestras se sintetizaron con dos sales diferentes de calcio, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y CaCl_2 . El análisis de difracción de rayos X, la espectroscopia Raman, la caracterización de microscopía electrónica de barrido y transmisión revelan partículas de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ con estructura hexagonal y un grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$ en ambos casos. Por otro lado se emplearon sustratos de Silicio poroso (SP), con diferentes tamaños y morfología, para cristalizar hidroxiapatita (HA) por medio de coprecipitación a temperatura ambiente, ya que es un método sencillo y económico. La formación *in situ* de nanopartículas de HA, dentro de la estructura de Silicio meso y macro-poroso, dio como resultado la formación de cristales de hidroxiapatita de tamaño nanométrico sobre la superficie y dentro de la estructura porosa. La técnica de difracción de rayos X se usó para determinar la estructura de los cristales. El análisis de resultados demuestra que bajo ciertas condiciones, el crecimiento y la cristalización de la hidroxiapatita sobre/dentro del SP se puede lograr a temperatura ambiente. Dichas estructuras compuestas amplían la posibilidad de diseñar un nuevo material biocompuesto basado en hidroxiapatita y el silicio, sintetizado a temperatura ambiente. Esto abre la posibilidad de ampliar la vista al diseño de nuevos materiales compuestos basados en la hidroxiapatita sintetizada a temperatura ambiente con otros materiales.

Abstract

In this work, a simple and no expensive procedure was performed to synthesize hydroxyapatite flake like nanostructures, by using a co-precipitation method with tannic acid as stabilizing agent at room temperature and freeze drying. As a result, material powder was obtained. Samples were synthesized with two different salts, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and CaCl_2 . X-ray diffraction analysis, Raman spectroscopy, scanning and transmission electron microscopy characterizations reveal $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ hydroxyapatite particles with hexagonal structure and $\text{P6}_3/\text{m}$ space group in both cases. In addition, Porous silicon (PS) substrates, with different pore sizes and morphology, have been used to crystallize hydroxyapatite (HA) by an easy and economical procedure using a co-precipitation method at room temperature. In situ formation of HA nanoparticles, within the meso- and macroporous silicon structure, resulted in the formation of nanometer-sized hydroxyapatite crystals on/within the porous structure. The X-ray diffraction technique was used to determine the structure of the crystals. Analysis/characterization demonstrates that under certain synthesis conditions, growth and crystallization of hydroxyapatite layer on/inside PS can be achieved at room temperature. This opens the possibility of expanding the view to the designing of new composite materials based on the hydroxyapatite synthesized at room temperature.

Introducción

La investigación en nanopartículas es un área de gran interés debido a la inmensa variedad de aplicaciones. El progreso de la micro- y la nanotecnología en las últimas décadas ha impactado enormemente en la investigación actual de las aplicaciones biomédicas. Nanopartículas de liberación controlada, puntos cuánticos, liberación dirigida y nanotecnología contra el cáncer se han estado estudiando intensamente y los resultados de sus aplicaciones biomédicas son muy alentadores [1,2]

El hueso (Figura 1) es un complejo altamente ordenado de tejido conectivo especializado que se compone de células embebidas en una materia intercelular profusa compuesta de colágeno y fosfato de calcio [3,4]. Las funciones biológicas de hueso incluyen: protección de los tejidos blandos y órganos sensibles, por ejemplo, la protección que ofrecen las costillas y el cráneo; además de soporte físico en la acción mecánica de los tejidos, esto es, contracción y expansión en los pulmones; así como la homeostasis de calcio [5]. Uno de los principales componentes estructurales del hueso es el fosfato de calcio que es similar a la hidroxiapatita con la relación molar de fosfato 5:3 (1.67 relación molar de Ca/P) cuya fórmula química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ [6-9].

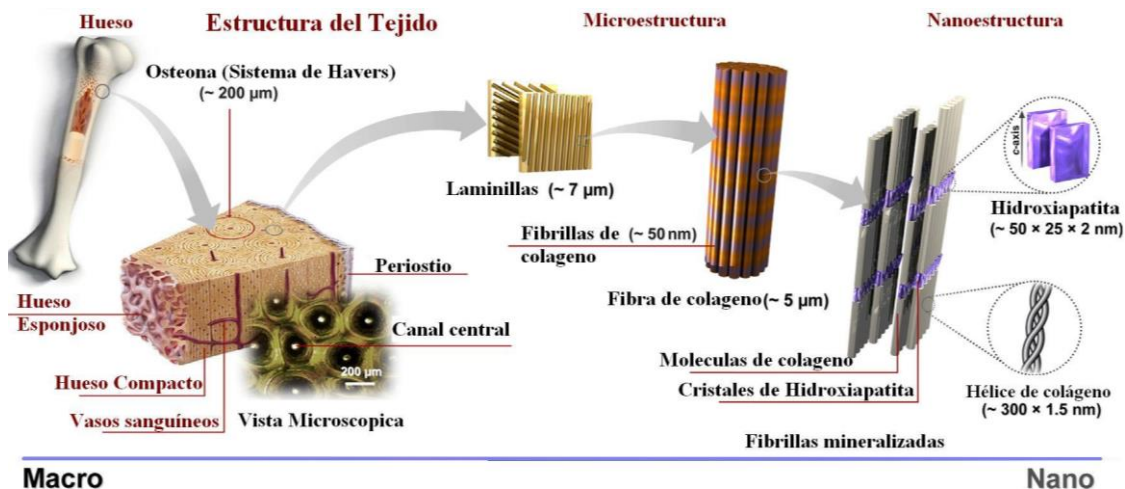


Figura 1. Estructura jerárquica del hueso en escalas de longitud [3].

Las técnicas para la reconstrucción de defectos óseos son importantes a fin de mantener la calidad de vida de los pacientes, ya que los huesos soportan nuestro cuerpo y nos permiten realizar diferentes movimientos. Aunque nuestro cuerpo tiene la habilidad de auto reconstruir el tejido dañado a través del suministro normal de nutrientes, la pérdida de hueso y su función puede conducir a la pérdida de función en los tejidos relacionados, por otro lado cuando la cantidad de hueso dañado es demasiado grande para la auto-reconstrucción en tal caso los huesos dañados se reconstruyen utilizando materiales alternativos. En la actualidad se han producido grandes avances en el desarrollo de materiales biomédicos para la sustitución de hueso. Tales como el uso de materiales cerámicos bio-activos, en particular la hidroxiapatita [10].

La hidroxiapatita (HA) es un fosfato de calcio similar en morfología y composición a los tejidos humanos duros. Particularmente, tiene una estructura hexagonal y una relación estequiométrica de Ca/P = 1.67 la cual es idéntica a la apatita ósea [11-15].

Una característica importante de la HA es su estabilidad en comparación con otros fosfatos de calcio. Termodinámicamente, la HA es el compuesto de fosfato de calcio más estable bajo condiciones fisiológicas como la temperatura, el pH y la composición de los fluidos corporales [12].

En los últimos años la HA, en tamaño nanométrico, ha sido de gran interés como biomaterial para uso en aplicaciones en prótesis debido a su similitud en tamaño, cristalografía y composición química con tejido duro humano, además el esmalte dental y el tejido óseo está compuesto principalmente de este material.

Debido a sus propiedades sobresalientes [16]:

- Biocompatibilidad
- Bioactividad
- Osteoconductividad
- No toxicidad y naturaleza no inflamatoria

La HA en tamaño nanométrico tiene una variedad de aplicaciones que incluyen:

- Ingeniería en tejidos óseos
- Desarrollo de cementos óseos para cirugía ortopédica, traumatológica, de columna vertebral, maxilofacial y dental.
- Agente desensibilizante en blanqueamiento de dientes
- Agente remineralizante en pastas dentales
- Suministro de fármacos y genes
- En la separación cromatografica de biomoléculas

En general durante una reacción de precipitación para la obtención de fosfatos de calcio se debe tener un cuidadoso control de las variables del proceso, ya que existe una relación muy cercana entre las diferentes fases que participan. En sistemas biológicos la observación importante en los huesos y los dientes es la baja cristalinidad de las partículas de HA, evaluada por los métodos de DRX (Difracción de Rayos X), con dominios de difracción que son más pequeños que las partículas. Este hecho apunta a la existencia de partículas formadas por agregación de cristales precursores de unos pocos nanómetros de tamaño. Esta baja cristalinidad también se observa en las primeras etapas en la precipitación de HA, aunque algunos autores indican una aglomeración progresiva ordenada de las partículas elementales iniciales para producir una partícula estructurada que presenta en consecuencia, una cristalinidad más alta [17].

El desarrollo de compósitos así como las tecnologías de diseño y fabricación relacionadas es uno de los avances más importantes en la historia de los materiales. Los compósitos son materiales multifuncionales que tienen propiedades mecánicas y físicas sin precedentes que pueden adaptarse para cumplir con los requisitos de una aplicación en particular [18].

Por todo lo anterior, el interés fundamental de este trabajo de tesis se centra en obtener nanoestructuras de HA con el propósito de optimizar el método de síntesis por coprecipitación y así emplear las nanoestructuras de HA para la elaboración de compósitos, permitiendo que una vez caracterizadas las muestras se podrían emplear dichos compósitos en estudios *in vitro* como *in vivo*.

Planteamiento del problema

Acabamos de ver que la hidroxiapatita es un material ampliamente estudiado por su importancia sobre todo en las aplicaciones médicas. Razón por la cual en la actualidad es posible encontrar un gran número de trabajos sobre los diferentes métodos de sintetizar este material, sin embargo, todos ellos en menor ó mayor complejidad dependen en alguna ó en todas sus etapas directamente de trabajar con temperaturas por arriba de 60 °C y por varias horas. Por lo anterior, para este trabajo nos hemos propuesto el siguiente:

OBJETIVO

Sintetizar y caracterizar hidroxiapatita nanoestructurada a temperatura ambiente para posteriormente fabricar un compósito basado en Silicio Poroso (SP) y HA para su aplicación en la posible regeneración de hueso e implantes.

METAS

Para llegar a cumplir con este objetivo, se plantearon las siguientes metas:

- 1.- Sintetizar HA a temperatura ambiente empleando ácido tánico como agente estabilizador en el crecimiento de las nanopartículas.
- 2.- Variar las condiciones experimentales de síntesis como el tiempo de reacción, y concentración de agentes precursores.
- 3.- Encontrar las mejores condiciones en la síntesis a temperatura ambiente para la obtención de HA y liofilizar las soluciones.
- 4.- Caracterizar sus propiedades para las diferentes muestras por las siguientes técnicas:
 - Difracción de Rayos X. (DRX)
 - Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)
 - Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)
 - ❖ Alta Resolución (HRTEM)

- ❖ Análisis Químico elemental (EDS)
- Espectroscopia Vibracional Raman.

- 5.- Analizar los resultados de la caracterización desde el punto de vista de la forma, tamaño y estructura cristalina.
- 6.- Relacionar los análisis estructurales por DRX, TEM con los vibracionales obtenidos con Raman.
- 7.- Construir el compósito con Silicio Poroso.
- 8.- Caracterizar el compósito por las técnicas antes mencionadas.
- 9.- Publicar artículos en revistas arbitradas de circulación internacional.
- 10.- Presentar trabajos en Congresos Nacionales y/o Internacionales.

Para poder realizar esta tarea, nos hemos propuesto llevar a cabo el trabajo en tres etapas diferentes, la primera consistirá en sintetizar la HA y caracterizarla, la segunda consistirá en construir el compósito a base de SP, y la tercera será realizar la aplicación en algún experimento biológico.

Se ha planteado para en la primera etapa, la posibilidad de sintetizar HA a temperatura ambiente utilizando un método que ha permitido hasta ahora, en el laboratorio de Materiales Avanzados en el Instituto de Física de la UNAM, sintetizar diferentes materiales a temperatura ambiente con gran facilidad y a un precio económico.

Para la segunda etapa del proyecto, se contempla la fabricación de compósitos, que como su nombre lo indica, son materiales que se diseñan a partir de dos o más componentes para formar un compuesto con propiedades superiores a las de sus partes.

Obtener un compósito entre Hidroxiapatita@Silicio Poroso se basa en la idea de promover el crecimiento cristalino (nucleación heterogénea) de la HA, con la posibilidad de preferenciar la forma, tamaño y la orientación de los cristales e incluso la fase cristalina, por lo que con este tipo de sustratos porosos se pretende mostrar la evidencia experimental de la formación de cristales de HA desde las esquinas de los poros o desde

las superficies rugosas de las paredes de los poros a temperatura ambiente, ya que existen diferentes estudios teóricos que predicen dicho fenómeno. Para esta parte de la investigación, usaremos sustratos de Silicio con diferentes dopantes, tipo-p y -n así como un péptido formado a partir de Silicio en polvo obtenido de una planta endémica.

Se incluyó una tercera etapa que sería una aplicación de la hidroxiapatita o de uno de los compósito construidos. Si bien al inicio de este trabajo no se tenía ninguna propuesta de aplicación, esta finalmente se presentó gracias a la colaboración con el grupo de la Unidad del Posgrado de la Facultad de Odontología de la UNAM y se pudo realizar parcialmente. Al presentar este reporte, el experimento completo de la aplicación no se ha terminado del todo, sin embargo ya se cuenta con unos primeros resultados los cuales se presentan en este trabajo.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES



Entre los minerales más representativos del grupo apatita, se encuentra la HA de fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, el cual desde el punto de vista biológico es el componente fundamental del tejido óseo y dental de todos los vertebrados. Sus datos cristalográficos se muestran en la tabla 1.1 [1].

Tabla 1.1 Datos Cristalográficos de hidroxiapatita.

Fórmula química	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Sistema cristalino	Hexagonal
Grupo espacial	$P6_3/m$
Parámetros de red	$a = b = 9.432\text{Å}$, $c = 6.881\text{Å}$
Volumen	53.014 nm^3
Densidad	3.140 g/cm^3
Peso molecular	502.32 g/mol
Z	2

Los materiales elaborados a partir de la (HA) no provocan reacción inmunológica apreciable al ser implantados en el organismo receptor, además, numerosas experiencias han demostrado que las cerámicas de hidroxiapatita son biocompatibles, bioactivas, bioestables y osteoconductoras [2,4].

La HA está presente en forma de cristales microscópicos impuros dentro del complejo ultraestructural en los tejidos mineralizados, por ejemplo, en el esmalte dental el tamaño del cristal es aproximadamente de $1 \mu\text{m}$ de largo y 50 nm de diámetro, mientras que en la dentina y hueso el tamaño es del orden de una magnitud más pequeño. Desde el punto de vista dental, la orientación de los cristales en el esmalte dental es de considerable

interés, ya que la disolución de los cristales en el proceso de caries procede más rápido en la dirección radial que en paralelo al eje c del cristal [2].

Las propiedades de la HA sintetizada están influenciadas por las características de tamaño y morfología de las partículas. La HA sinterizada, se emplea frecuentemente en cirugía ya que tiene una superficie de apatita que es responsable de la biocompatibilidad con el tejido duro, mientras que en aplicaciones orales, maxilofaciales y ortopédicas, las cerámicas de HA se han empleado principalmente como partes no soportantes en forma de polvos y gránulos o compósitos con resinas y polímeros ofreciendo sistemas con buena osteoconductividad y bioactividad ya que aumentan la densificación y mejoran la resistencia a la fractura[3].

La influencia de los métodos de preparación en las propiedades químicas de la HA ha sido ampliamente investigada durante los últimos 20 años. Una razón de esto, es que la HA es estable en una amplia gama de composiciones además de aceptar una gran variedad de sustituciones aniónicas y catiónicas. Como consecuencia, el comportamiento como biomaterial puede ser fácilmente modificado, por ejemplo la textura y morfología de la HA son sensibles a las condiciones de preparación y por lo tanto la obtención de hidroxiapatita con características deseadas podría ser adaptada por la elección apropiada de la ruta de síntesis.

Numerosos estudios sobre síntesis de polvos de hidroxiapatita aparecen reportados en la literatura, destacando algunas características finales de los polvos como morfología y tamaño de partícula, estas características pueden ser asociadas a la complejidad del método particular de preparación. A modo general, polvos de hidroxiapatita con tamaños de partícula de escala micrométrica a nanométrica, pueden obtenerse mediante reacciones de estado sólido, precipitación química, síntesis hidrotermal, secado por aspersión, electrodeposición, sol-gel, micro emulsión, y radiación de microondas, entre otros métodos.

En el proceso sol-gel por ejemplo, se reporta que el gel producido es envejecido por 24 hr para posteriormente ser secado en un horno a 80 °C por otras 24 hr [4], para finalmente

los geles secos ser sometidos a un proceso de sinterizado a una velocidad de 5 °C/min hasta llegar a los 600 °C en un horno de mufla.

La síntesis hidrotermal ha sido definida en términos generales como una tecnología para la cristalización de materiales y compuestos químicos directamente de solución acuosa mediante el control adecuado de variables termodinámicas (temperatura, presión y composición química) y no termodinámicas como la agitación, la cual se realiza usualmente a presión autógena, que es la presión de vapor saturado de la mezcla hidrotermal a una determinada temperatura y composición [5]. Del mismo trabajo se sabe que los reactantes usados en síntesis hidrotermal normalmente son llamados precursores y son administrados en forma de soluciones, geles y suspensiones, mientras que, los aditivos orgánicos o inorgánicos son usados para promover la dispersión de partículas o controlar la morfología cristalina.

En otro trabajo diferente [6], del llamado método hidrotermal se reporta que el tamaño de las partículas de hidroxiapatita incrementa con el aumento en la temperatura en un intervalo de 50 – 150 °C durante un proceso de 12 a 24 hr. La síntesis hidrotermal permite obtener polvos de hidroxiapatita con alto grado de cristalinidad y una relación Ca/P cercana al valor estequiométrico [7]. La gran ventaja de la síntesis hidrotermal se encuentra en las temperaturas relativamente bajas de tratamiento térmico, esta técnica de síntesis suele potenciarse mediante el uso de microemulsiones y de ese modo, resulta muy versátil en la obtención de nanopartículas de hidroxiapatita con una relación Ca/P estequiométrica y morfologías muy variadas.

En el caso de la precipitación química, parámetros como la cristalinidad y la relación Ca/P del producto obtenido, en muchos casos, son inferiores al de una hidroxiapatita estequiométrica y bien cristalizada [7].

El secado por aspersion es una técnica que se puede aplicar para preparar partículas de revestimiento, el proceso completo se compone básicamente por una secuencia de cuatro pasos: atomización, mezcla de pulverización y aire, evaporación y separación del producto. En trabajos como el reportado en [8], el producto se seca a 180 °C y posteriormente se calcina entre 500 °C y 800 °C.

Los recubrimientos por electrodeposición de hidroxiapatita, se realizan en una celda electroquímica de tres electrodos, para [9] la solución de deposición se prepara por disolución de sales de calcio y fosfato con relación Ca/P de 1.67, esta solución se controla mediante una placa caliente (80 °C) durante 30 min.

Para la síntesis de hidroxiapatita por microemulsión, por ejemplo en [10], se lleva a cabo a temperatura de 85 °C empleando agarosa en un medio altamente alcalino, obteniendo hidroxiapatita B-carbonatada meso y macroporosa. Por su parte, en trabajos donde la radiación por microondas es un proceso de calentamiento volumétrico, por ejemplo [19], se minimizan los gradientes térmicos dentro de los materiales que se procesan para obtener hidroxiapatita, proceso que se lleva a cabo a una temperatura de 70 °C durante dos horas.

El proceso de precipitación de HA a diferentes condiciones, muestran estequiometría (relación molar Ca/P), en un intervalo de 1.49 a 1.80, pero de acuerdo a las condiciones también varía la cristalinidad del material así como los parámetros de la celda unidad, por lo que $a=b$ y c , varían de 9.4133 Å a 9.4407 Å y de 6.8634 Å a 6.8882 Å, respectivamente. Los parámetros de red $a=b$ tienden a disminuir con el aumento de la relación molar Ca/P mientras que c tiene comportamiento opuesto, cabe mencionar que la variación de los parámetros $a=b$ y c pueden estar asociados a la presencia de impurezas de iones carbonato [6]. Los cristales de HA se disponen en cúmulos pequeños y grandes pleomórficos con una longitud de alrededor de 50-200 nm y un diámetro de alrededor de 10-30 nm [20, 21].

Recientemente en [22] reportan la síntesis de hidroxiapatita a temperatura ambiente, sin embargo, en la descripción del proceso de síntesis indican que una vez preparada la solución donde preparan la mezcla, es horneada a 80°C durante una hora.

El mecanismo de precipitación de HA sigue una serie de eventos como son nucleación/agregación/crecimiento. De acuerdo con el mecanismo predominante, se pueden obtener partículas de HA con diferentes tamaños y morfologías: partículas monodispersas con tamaños que van del orden nanométrico a micrométrico así como agregados irregulares y ordenados. El modo en el cual la agregación toma lugar juega

un papel importante en la determinación de la forma y tamaño final de las partículas de HA [23].

Algunos autores [24] enfatizan que la tendencia actual de investigación en biocerámicas, se enfoca a cubrir las limitaciones de los fosfatos de calcio y la hidroxiapatita en particular, con el objeto de mejorar sus propiedades como biomaterial mediante la exploración de las ventajas únicas que ofrece la nanotecnología. Esta tendencia, se basa en el hecho de que los huesos son nanocompositos naturales, constituidos por un 69 % de fosfato de calcio en la forma de hidroxiapatita cristalizada y/o fosfato de calcio amorfo, siendo los cristales de hidroxiapatita con morfología de láminas o agujas y dimensiones típicas de 20 - 80 nm [24, 25].

La conformación de implantes óseos basados en nanopartículas, presenta la ventaja de que éstas pueden ser sinterizadas a temperaturas más bajas debido a su mayor área superficial. Adicionalmente, resulta factible mejorar simultáneamente, el desempeño biológico y mecánico de los implantes óseos mediante el control de características de los polvos tales como tamaño y forma de las partículas, distribución de tamaño de partícula y grado de aglomeración [24].

Silicio Poroso

El Silicio poroso (SP), es formado por medio de un ataque electroquímico con ácido fluorhídrico (HF), como su nombre lo indica, el bulto de Silicio cristalino cambia por el proceso de ataque a una estructura tipo esponja con poros y columnas interconectadas de silicio, cubiertas por compuestos principalmente con Oxígeno e Hidrógeno. El ancho de los poros y el esqueleto de Silicio dependen fuertemente del tipo de impurezas y de las condiciones de ataque. Se ha encontrado que el diámetro de los poros puede ser tan pequeño como 2 nm y los intervalos de porosidad son típicamente entre 20 y 80 %. El interés tecnológico del SP es su gran cociente entre la superficie y el volumen ($>200 \text{ m}^2/\text{cm}^3$), lo que le confiere una gran reactividad, además de ser biocompatible [26], y en ciertas condiciones biodegradable.

La formación de SP mediante ataque químico es un proceso complejo. En el sistema Si-HF (Silicio y Ácido Fluorhídrico) el proceso de ataque puede ser influenciado por una variedad de factores tales como: (i) la disolución electroquímica, (ii) las propiedades semiconductoras del silicio, (iii) transporte de portadores en el semiconductor, (iv) transporte de iones en el electrólito y (v) fenómenos superficiales en la forma de irregularidades sobre el Si o la tensión superficial del líquido.

Estas características permiten una gran variedad de aplicaciones tales como dispositivos fotónicos, sensores basados tanto en propiedades eléctricas como ópticas y diversas aplicaciones médicas tales como suministro inteligente de medicamentos en el cuerpo, sustratos para inducir el crecimiento cristalino de proteínas e implantes de hueso, etc [27]. El SP tiene la capacidad de disolverse en soluciones acuosas o en ambientes fisiológicos simulados mostrando una completa biodegradabilidad. Un atributo positivo del SP es que se degrada principalmente en ácido ortosilícico, el cual es la forma natural de encontrar al Silicio en la naturaleza [1,28]. Se ha demostrado que la velocidad a la cual el SP es degradado por el cuerpo es modulable en función de su química de superficie. Por otro lado, se ha evidenciado que generando un amplio intervalo de porosidad en el SP, su comportamiento puede ser modulado desde un material relativamente bioinerte hasta uno bioactivo e incluso reabsorbible [29]. Algunos estudios *in vitro* involucran la inmersión de varios tipos de materiales en fluidos corporales simulados, mostrando que en el caso de silicio meso y nanoporoso con adecuadas porosidades, se induce la precipitación sobre su superficie de una forma de hidroxiapatita [30]. Todas estas observaciones demuestran las potencialidades del SP para la construcción de dispositivos implantables *in-vivo* para la liberación controlada de fármacos, reemplazamiento de procesos corporales fallidos, etc. Además, el SP puede ser fácilmente integrado a la electrónica convencional haciendo factible la posibilidad de desarrollar biodispositivos inteligentes [31-33].

Desde un punto de vista biológico el Silicio es un nutriente esencial, que se ha relacionado con la salud de los tejidos conectivos y huesos [4,34]. Estudios llevados a cabo por Carlisle en 1970 [35], identificaron la formación ósea anormal debido a la

deficiencia de Silicio que fue confirmado posteriormente por Schwarz [36,37], quien lo reconoció como un agente de reticulación en tejidos conectivos además de su importancia para la salud vascular. Se ha informado que los huesos y músculos se unen directamente a los materiales biocerámicos que contienen Silicio y presentan mejor bioactividad debido a su presencia.

Un enfoque alternativo para la mejora de la bioactividad de los implantes de HA es modificar la química del implante, es decir incorporar Silicio en la fase pura de HA lo que ha demostrado aumentar significativamente la tasa de aposición ósea a un implante biocerámico [27,38-43]

Hay que resaltar que la porosidad del Silicio promueve la osteointegración, además, el ácido ortosilícico presente en concentraciones fisiológicas (5-20 mN), estimula la síntesis de colágeno tipo I así como el aumento de la diferenciación de osteoblastos [44], y existe un efecto sinérgico en el tratamiento con silicio y calcio en la estimulación de la actividad celular ósea en comparación con el tratamiento de elementos aislados [45].



CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA Y CARACTERIZACIÓN

2 Metodología

El desarrollo experimental de este trabajo se divide en tres pasos principales, primero se llevó a cabo la síntesis de HA por medio de técnicas de precipitación, posteriormente la HA se caracterizaron por difracción de rayos X (DRX), espectroscopia Raman, microscopía electrónica de barrido y transmisión (MEB y MET) para determinar su estructura. Finalmente, empleando la técnica de coprecipitación se sintetizaron nanoestructuras de HA empleando Silicio Poroso como centro de nucleación y se llevó a cabo la caracterización estructural de las fases involucradas en el proceso por medio de DRX, MET convencional y MET de alta resolución, así como Raman y MEB. La descripción detallada de los procesos se da a continuación.

Los equipos de laboratorio, así como los reactivos que fueron utilizados para la síntesis y caracterización de las muestras obtenidas fueron los siguientes:

Reactivos:

- A) Agua destilada marca J.T Baker
- B) Nitrato de calcio tetrahidratado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, 99%)
- C) Cloruro de calcio dihidratado $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, 99%)
- D) Ácido fosfórico H_3PO_4 (Sigma-Aldrich, 85%)
- E) Ácido tánico $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$ (Sigma-Aldrich >99%)
- F) Hidróxido de tetrapropil amonio $\text{N}(\text{C}_3\text{H}_7)_4\text{OH}$ (Sigma-Aldrich, 25%)
- G) Silicio poroso tipo n
- H) Silicio poroso tipo p

Equipos de Laboratorio:

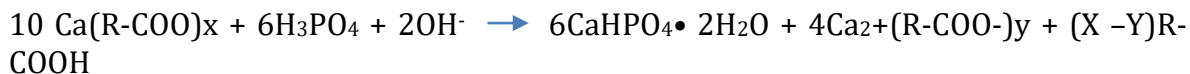
- A) Balanza analítica. Pioneer OHAUS
- B) Potenciómetro. ThermoScientific. Orion 3Star
- C) Liofilizadora. LABCONCO. Free Zone

2.1 Obtención de la HA

Dadas las condiciones de infraestructura en el laboratorio y después de una revisión bibliográfica exhaustiva para llevar a cabo la síntesis de HA, en este caso se decidió trabajar con el método de coprecipitación a temperatura ambiente empleando dos sales de calcio y siguiendo la estequiometría indicada por Puvvada [46].

Muestras con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

El hidróxido de tetrapropil amonio es un hidróxido de amonio cuaternario que está compuesto por cationes cuaternarios de amonio (R_4N^+) e hidróxido OH^- , es una base tan fuerte que se ioniza completamente, por lo cual se propone la formación de los siguientes intermediarios en la formación de hidroxiapatita:



Se prepara una solución de ácido tánico al 2 %, cloruro de calcio dihidratado 0.2 M, ácido fosfórico 0.12 M e hidróxido de tetrapropil amonio 0.2 M. Las soluciones acuosas de ácido tánico y cloruro de calcio dihidratado son mezcladas en un matraz de bola de tres cuellos y se mantiene en agitación a una velocidad de 300 rpm durante 20 min.

Transcurrido el tiempo se adiciona 0.1 mL/min de H_3PO_4 previamente ajustado a pH 9 con hidróxido de tetrapropil amonio, cabe mencionar que el ajuste de pH del ácido fosfórico es un proceso paulatino. El pH de la solución resultante se mantiene en un intervalo de 7-10. La mezcla de reacción finalmente se deja en agitación por un periodo de 24 horas, todo a temperatura ambiente. Las muestras se lavan tres veces con una mezcla de metanol-agua destilada (1:2) para su posterior caracterización.

La reacción química involucra los siguientes procesos:



En cada experimento las sales precursoras siempre son preparadas en el momento que se lleva a cabo la síntesis. La Figura 1 muestra las disoluciones obtenidas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ que da lugar a una solución amarilla.



Figura. 1 Formación de los complejos $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Cuando se lleva a cabo una reacción química, la observación experimental es una herramienta importante, ya que esto nos da una idea de si el proceso se está llevando por buen camino, ya que podemos verificar si se obtiene un precipitado (Figura 1), lo cual es una señal de éxito de una fase estable. En todas las sesiones de síntesis se puede observar que cambios ocurrieron, el primer cambio que se observa es la formación de coloración blanquecina, para que finalmente, se obtenga el precipitado de color amarillo. (Figura 2).



Figura. 2 Cambios en la coloración durante la síntesis de Hidroxiapatita de izquierda a derecha, blanco y amarillo.

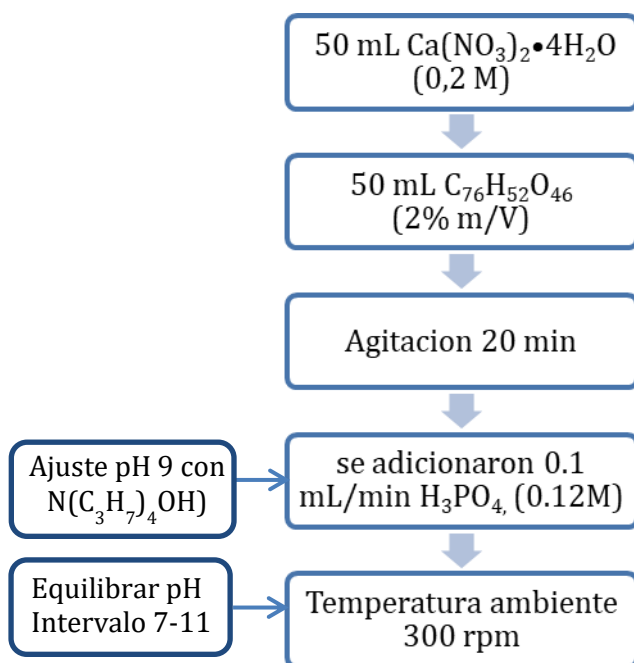
La síntesis de nanopartículas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en un medio acuoso por la precipitación de los iones Ca^{2+} involucra el siguiente proceso (Figura 3) [47].



Figura.3 Diagrama completo del proceso de síntesis de hidroxapatita.

A medida que se va agregando el agente precipitante, éste influye en la formación de los intermediarios hasta la total formación de la Hidroxapatita, ya que es un factor importante en el control de la nucleación y el crecimiento de las nanopartículas.

Muestras con Ca(NO₃)₂•4H₂O



Las muestras obtenidas en los diferentes procesos de síntesis se lavaron de tres a cinco veces con una mezcla de metanol-agua destilada (1:2). El secado de la muestra

se llevó a cabo por liofilización (freeze drying), introduciendo el recipiente que contiene la solución lavada en nitrógeno líquido ($T=77\text{ K}$) hasta la congelación de la muestra y posteriormente haciendo vacío durante 12 hrs se eliminó el líquido para obtener los polvos de HA para su caracterización.

En la Tabla 2 se enlistan las diferentes muestras que se sintetizaron y caracterizaron a lo largo de este trabajo, donde se indican los diferentes calcio que se utilizaron y como se fueron ajustando los valores de pH finales. En el siguiente capítulo se mostrarán resultados de una selección de estas muestras en función de los resultados.

Nombre	Fuente de Calcio	pH final síntesis
MP1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [0.1M]	13
MP2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [0.1M]	12.31
MP3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [0.1M]	10
MP4	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [0.1M]	10
M3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [0.2M]	8
M4	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [0.2M]	8
M5	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [0.2M]	9
M6	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [0.1M]	10
M7	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [0.1M]	8.8
M8	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [0.1M]	9
M9	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [0.2M]	8.6
M10	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [0.2M]	9
M11	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [0.2M]	10
M13	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [0.2M]	10
MC	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [0.2M]	9

MC2	CaCl ₂ • 2H ₂ O [0.2M]	9
MC3	CaCl ₂ • 2H ₂ O [0.2M]	10
M72	Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O [0.2M]	10.4
MJ72	Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O [0.2M]	10.6

Tabla 2. Relación de las muestras sintetizadas a lo largo de este trabajo.

2.2 Obtención de Compósitos

Sustrato SP-n y SP-p

Inicialmente los sustratos de Silicio Poroso se lavaron en una dilución de metanol en agua, una vez secos se hizo pasar un flujo de nitrógeno sobre la superficie de las pequeñas placas.

Se prepararon las siguientes soluciones siguiendo la estequiometría de la reacción química ácido fosfórico 0.12 M; hidróxido de tetrapropil amonio 0.2 M y nitrato de calcio tetrahidratado 0.1 M. El ácido fosfórico fue ajustado a pH 9 con hidróxido de tetrapropil amonio, mediante un proceso paulatino.

Para obtener los compósitos HAp@SP-n y HAp@SP-p, las muestras se sumergieron verticalmente en una solución que contenía los precursores mencionados anteriormente. La solución se mantuvo en contacto con la mitad inferior de la capa porosa y se infiltra en la parte superior por capilaridad en toda la estructura porosa. Aunque la parte inferior de la planilla de SP está fracturada debido a la agitación constante durante el proceso de síntesis, se forma la estructura de HA dentro/sobre la mitad superior de la estructura de SP por acción capilar de los precursores. Después de la síntesis los compuestos HAp@SP-n y HAp@SP-p se lavan con una solución muy diluida de metanol para su posterior caracterización.

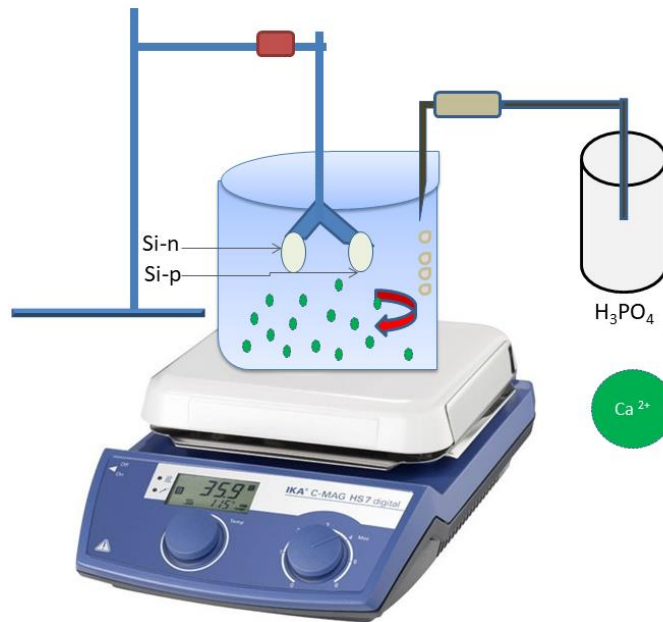


Figura.4 Crecimiento de nanopartículas de HA en Silicio poroso tipo n y p, mediante síntesis por coprecipitación.

2.3 Sustrato de Silicio Poroso obtenido de una planta endémica Cola de Caballo (*Equisetum laevigatum*)

La propuesta para llevar a cabo la nucleación de HA en Silicio poroso (polvo), fue trabajar con soluciones precursoras más diluidas para poder distinguir las dos fases y en este caso el crecimiento cristalino de HAp. Por lo que se preparó SiO_2 al 2.6%, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2.8 mM), H_3PO_4 (1.6 mM) ajustando el pH a 9 empleando $\text{N}(\text{C}_3\text{H}_7)_4\text{OH}$ (1.6 mM).

Inicialmente se mezclaron 50 mL de nitrato de Calcio tetrahidratado y 50 mL de Silicio Poroso en un matraz de tres cuellos manteniendo en agitación a 200 rpm. Después de 10 min se agrega 0.1 mL/min de ácido fosfórico monitoreando que el pH se mantuviera en un intervalo de 7-9. Posteriormente se lavaron las muestras de 3 a 5 veces con una mezcla de metanol: agua (1:2) para liofilizar las muestras y posteriormente llevar a cabo su caracterización.

2.4 Fabricación de andamios Péptido@ Hidroxiapatita

Se prepara una solución de 200 µg de CEMP1 (péptido)[48], nitrato de Calcio tetrahidratado 40 mM, ácido fosfórico 24 mM e hidróxido de Potasio 0.2 M. Las soluciones de péptido y nitrato de Calcio tetrahidratado se mezclaron en un matraz de bola de tres cuellos y se mantuvieron en agitación a una velocidad 300 rpm durante 20 min.

Transcurrido el tiempo se adiciona 0.1 mL/min de H₃PO₄ previamente ajustado a pH 9 con hidróxido de tetrapropil amonio, cabe mencionar que el ajuste de pH del ácido fosfórico es un proceso paulatino. El pH de la reacción resultante se mantiene en un intervalo de 7-8. La mezcla de reacción finalmente se deja en agitación por un periodo de 24 horas, todo a temperatura ambiente.

Posteriormente se recortaron discos de Gelfoam a un diámetro de 9 mm, y fueron esterilizados con luz UV. Una vez realizado esto, se prepararon una solución de 100 µL de Péptido@Hidroxiapatita, péptido, hidroxiapatita y se incubaron toda la noche, para permitir la penetración de los compuestos al Gelfoam para realizar el procedimiento quirúrgico de implantación en las calvarias de rata, previa preparación del defecto de tamaño crítico y practicando eutanasia después de 30 días para su posterior evaluación del tejido.



Figura 5. Gelfoam con solución de Peptido@Hidroxiapatita.

2.5 Caracterización

Todas muestras enlistadas en la Tabla 2, fueron caracterizadas por las siguientes técnicas y equipos:

Difracción de rayos X

Los difractogramas fueron registrados en un difractómetro D8 ADVANCE BRUKER AXS con tubo de Cobre (Cu K = 1,5418 Å) y monocromador de grafito. Las condiciones del generador de rayos X fueron de 25 mA y 35 kV. El intervalo 2θ fue de 10 a 80°, para todos los difractogramas, con una rapidez de barrido de 0.02 °/s. Los difractogramas, para su interpretación, fueron comparados con la base de datos del Archivo de Patrones de Difracción (Powder Diffraction File, PDF 0721243).

Microscopía Electrónica de Barrido

Microscopio electrónico de Barrido JSM-7800F que se encuentra en el Instituto de Física de la UNAM, y microscopio electrónico de barrido modelo Auriga Zeiss FEG 25 kv que se encuentra en la Universidad de Texas en San Antonio.

Microscopía Electrónica de Transmisión

Los estudios por microscopia electrónica de transmisión incluyen la obtención de imágenes a diferentes ampliaciones y la técnica denominada contraste Z (HAADF por sus siglas en inglés) así como análisis químico elemental “EDS” y fueron realizados con un microscopio JEOL JEM-2010F FasTem a un voltaje de aceleración de 200 kV que corresponde a $\lambda=0.0021$ nm y un coeficiente de aberración esférica de 0.5 mm. Se utilizaron rejillas de 300 mesh con cubierta de carbón, sobre las cuales se depositaron los polvos de cada una de nuestras muestras. En este caso se utilizaron dos microscopios similares, uno que se encuentra en el Instituto de Física de la UNAM y otro en la Universidad de Texas en San Antonio.

Espectroscopia Raman

La caracterización por espectroscopia Raman, se llevó a cabo en un equipo, que contiene un Microscopio confocal para seleccionar la zona de la muestra que se quiere analizar, el detector Raman marca Thermo Scientific DXR Raman Microscope con laser a una longitud de onda de 532 nm, con un máximo de potencia de 10 mW en el intervalo de (3000-50) cm^{-1} .

CAPÍTULO 3



RESULTADOS

3.1 Obtención de Hidroxiapatita

Como se describió en el capítulo anterior, la etapa inicial del trabajo es la obtención de HA por medio de coprecipitación a temperatura ambiente, seguida de la caracterización del mismo para determinar su estructura.

De acuerdo con los antecedentes, el proceso para llevar a cabo la síntesis de HA requirió de un cuidadoso control de las variables involucradas, principalmente del pH así como la concentración de los reactivos ya que pequeñas variaciones en estos parámetros generaba cambios importantes en la fase que precipita.

Como se mencionó en el capítulo anterior, se presenta una selección de resultados con aquellas muestras sintetizadas donde se obtuvo de manera sistemática la HA y para contrastar y enfatizar los ajustes realizados, se presenta un ejemplo de cuando no se obtuvo HA.

Muestra MP1

Después del proceso de liofilización con lo cual se obtienen las muestras en polvo, éste se puede describir como polvo de color hueso, formada por aglomerados. La Figura 6 muestra el análisis de rayos X y espectroscopia Raman de la muestra.

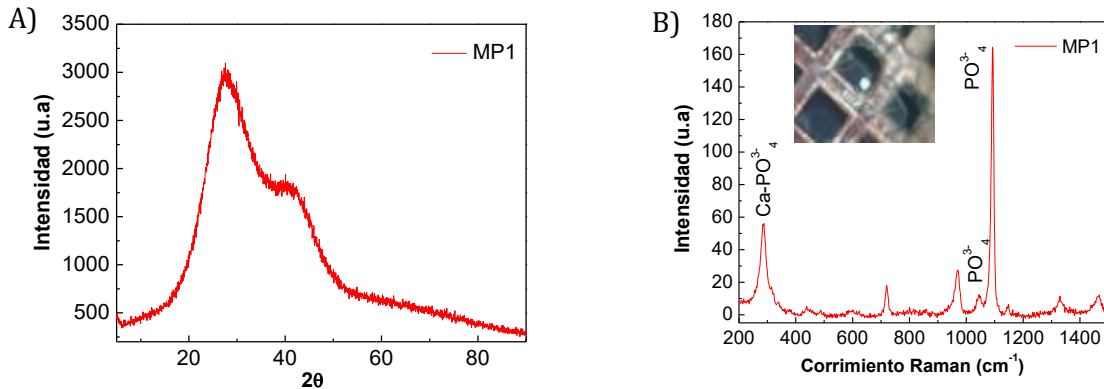


Figura 6. Muestra los resultados obtenidos empleando $(CaCl_2 \cdot 2H_2O)$ La Fig. 5A) Patrón de difracción de rayos X de MP1, B) Espectro Raman de MP1.

Una de las virtudes de la técnica de rayos X es la determinación de la estructura cristalina del material que se obtiene por un método de síntesis. El compuesto que se obtuvo empleando $(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ para la obtención de HA no presenta cristalinidad y tiene más aspecto de material amorfo, lo cual nos dice que las condiciones de concentración y pH no fueron las adecuadas ya que la solubilidad del $(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ por arriba de pH 10 impide la formación de los intermediarios en la síntesis de HA formándose un precipitado antes de una reacción final, y como sabemos para que se lleve a cabo la formación de un nuevo compuesto los precursores deben estar en solución ya que en sólido es muy difícil llevar a cabo la reacción para la formación de un nuevo compuesto.

Por otro lado, el análisis Raman muestra las señales del grupo fosfato así como del calcio, pero no en las frecuencias que corresponden a la estructura de hidroxiapatita.

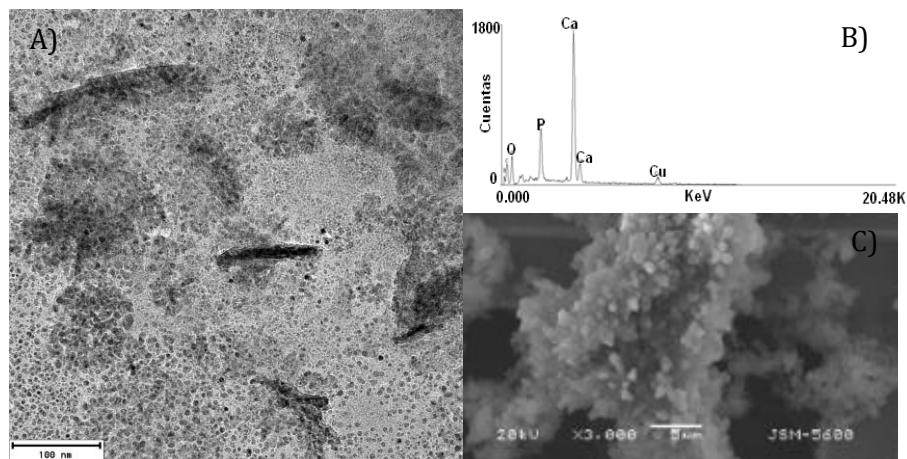


Figura 7 Imágenes representativas de A) TEM y C) SEM de HA con su correspondiente análisis, B) EDS Muestra la morfología de las nanopartículas de HA preparadas a pH 13.

Una característica importante en la morfología de la HA es que crece en forma de agujas, es decir crece preferencialmente en el eje C de la estructura hexagonal del cristal. Como podemos observar en la Figura 7 no se observan estas características, al contrario, observamos grandes agregados de calcio-fosfato. El análisis EDS detecta los elementos de Ca, O y P lo cual por un lado nos indica que el proceso de lavado ayuda a

eliminar los reactivos empleados en la síntesis y que solo están presentes los elementos de HA pero sin haber llegado a la estructura cristalina.

Muestra MP3

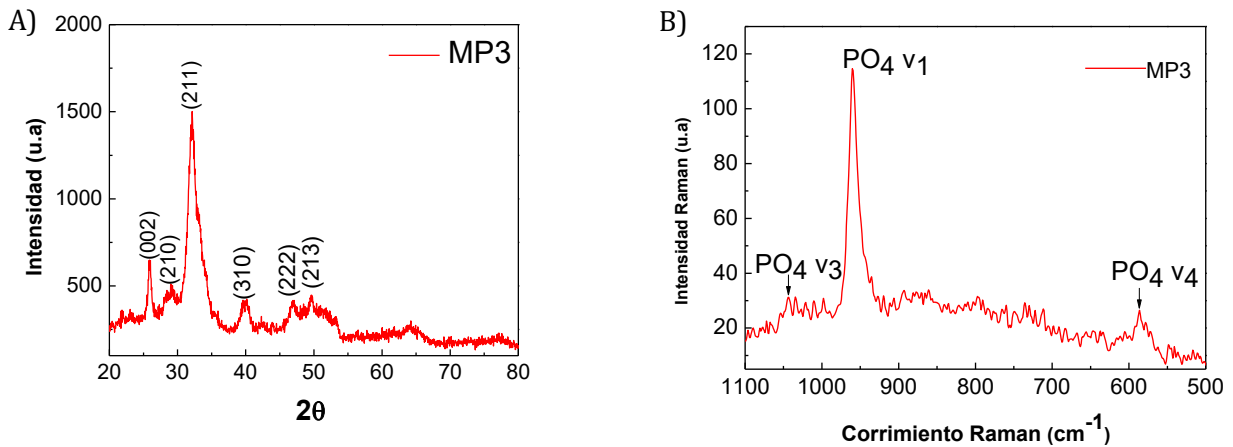


Figura.8 Muestra los resultados obtenidos empleando $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La Fig. 7a) Patrón de difracción de rayos X de HAP. b) Espectro Raman de HA.

El patrón de difracción de rayos X (Figura 8a) muestra la fase de HA con celda hexagonal y sin la presencia de otras fases. Las frecuencias de los modos normales de PO_4^{3-} en el espectro Raman (Figura 7b) 1045.34 cm^{-1} (ν_3) y el pico en 282 cm^{-1} es producido por los modos de traslación de Ca-PO_4 .

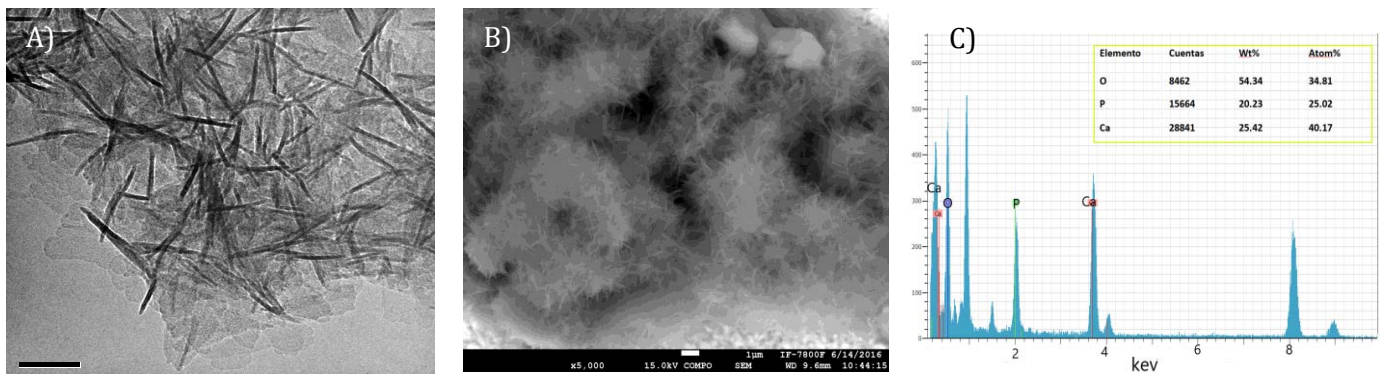


Figura 9. Imagen representativa de A) TEM y B) SEM de HA con su correspondiente análisis C) EDS. Muestra la morfología de las nanopartículas de HA preparadas a pH 11.

Se puede observar en las imágenes de microscopia electrónica de barrido y transmisión (Figura 9), que la muestra presenta la morfología característica de nanopartículas de HA, aunque el análisis EDS presenta una relación de Ca/P de 1.5 (Ca=40.17%, P=26.48%) muy cercano a HA sintética a altas temperaturas.

Muestra MP4

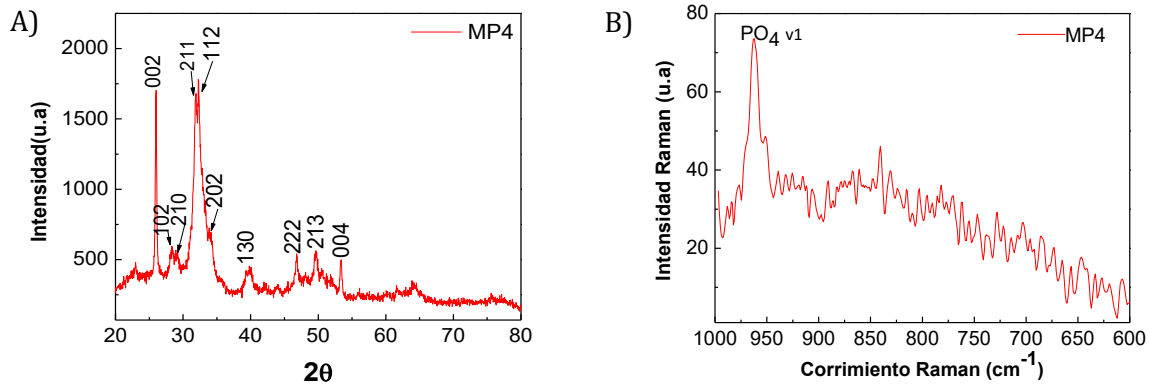


Figura 10. Muestra los resultados obtenidos empleando $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A) Patrón de difracción de rayos X de HA. B) Espectro Raman de HA.

El patrón de difracción de rayos X de esta muestra (Figura 10A), presenta los principales planos cristalinos de la fase cristalina de HA, y el espectro Raman (Figura 10B) muestra los modos de frecuencias normales ν_1 de PO_4^{3-} (960.7cm^{-1}) que corresponde a la señal del grupo fosfato en HA.

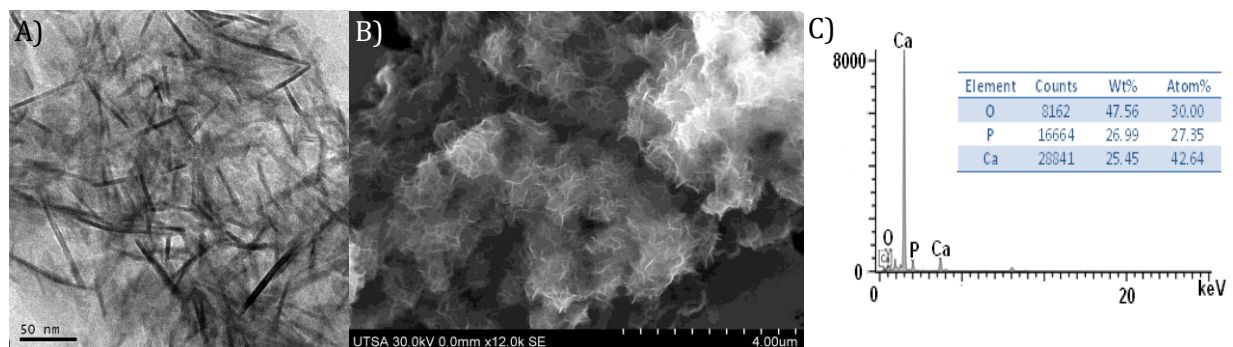


Figura 11. Imágenes representativas de TEM (A,B) de HA con su correspondiente análisis C) EDS.

La Figura 11 muestra la morfología de la muestra obtenida a pH 8 que es característica de HA además por alta resolución se observa la estructura cristalina del material. La relación Ca/P determinado por EDS, fue de 1.559 (Ca=42.64%, P=27.35%).

Muestra M8

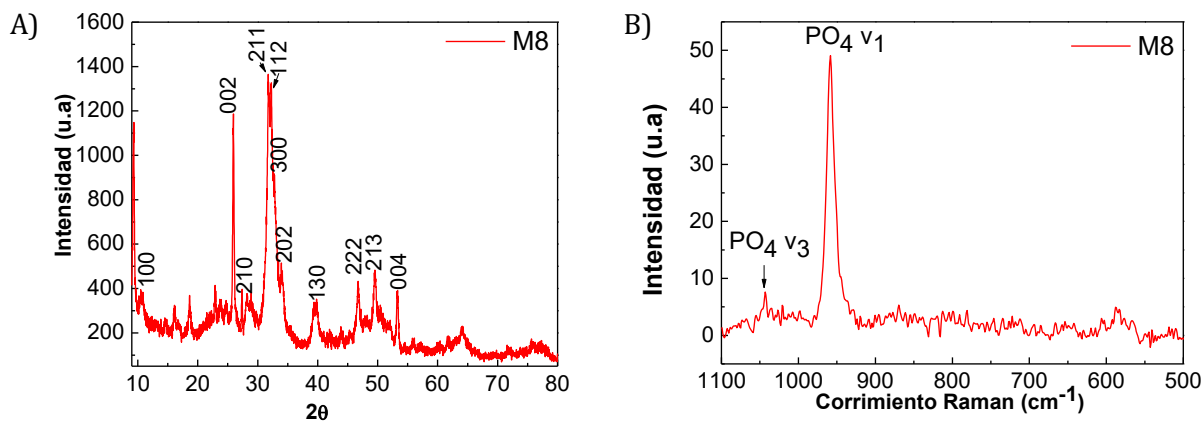
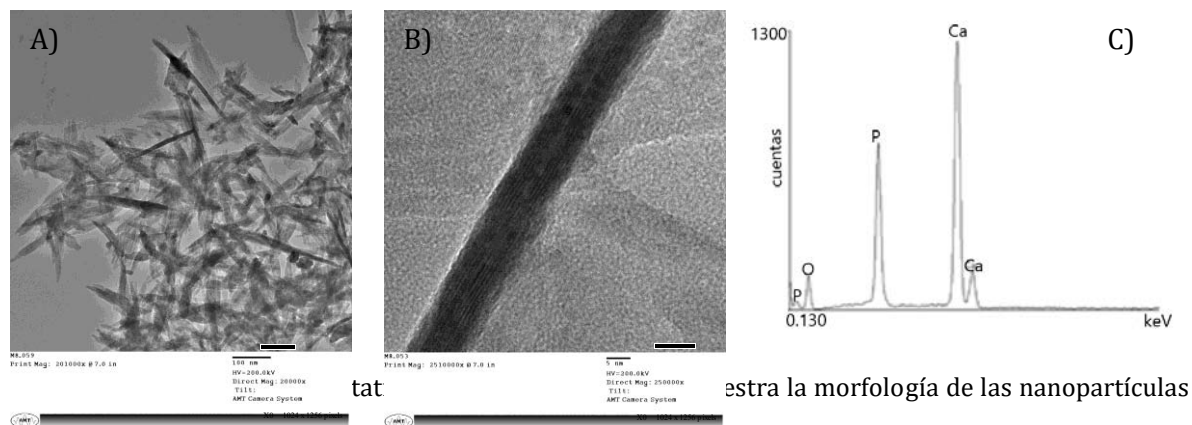


Figura 12. Muestra los resultados obtenidos empleando Ca(NO₃)₂•4H₂O. a) Patrón de difracción de rayos X de HA. b) Espectro Raman de HA.

El patrón de difracción de rayos X (Figura 12a) muestra la fase de HA con celda hexagonal sin la presencia de otras fases, cabe mencionar que el pH de esta muestra fue de 10 lo cual indica que el pH es un factor importante en la cristalinidad de las nanopartículas de HA. Las frecuencias de los modos normales de PO₄³⁻ en el espectro Raman (Figura 12b) se observa a 956.20 cm⁻¹ (v₁) y 1044.46 cm⁻¹ (v₃).



Por su parte, la Figura 13A y 13B) HRTEM muestran la morfología característica de las nanopartículas de HA y el análisis EDS muestra la relación Ca/P de 1.60 (Ca = 40.17%, P = 25.02%).

Muestra M9

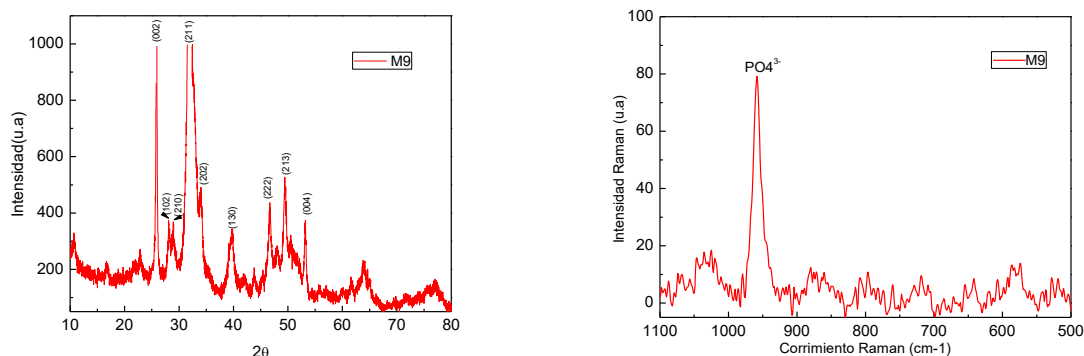


Figura 14. Muestra los resultados obtenidos empleando $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. a) Patrón de difracción de rayos X de HA. b) Espectro Raman de HA.

La Figura 14a) muestra el patrón de difracción de rayos X que corresponde a la fase cristalina de HA con celda hexagonal y no hay evidencia de otra fase presente. Las frecuencias de los modos normales de PO_4^{3-} en el espectro Raman (Figura 14b) de 959cm^{-1} (ν_1) corresponde a la señal de HA.

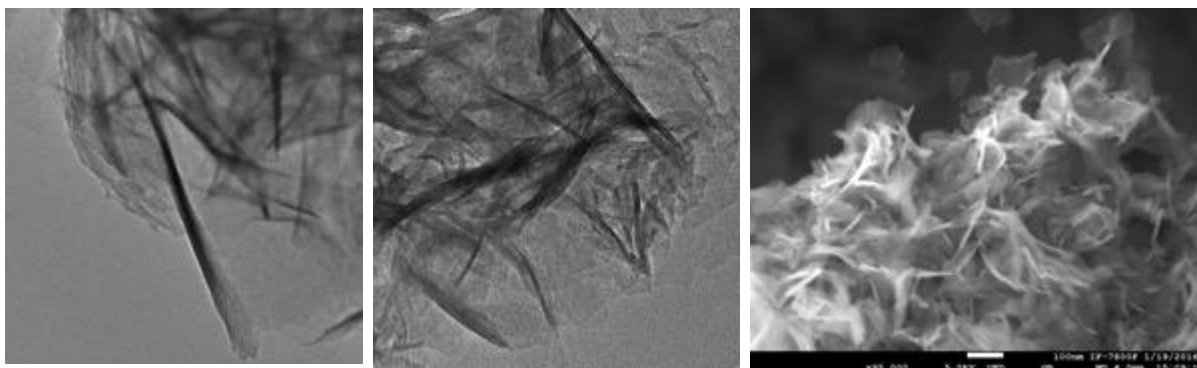


Figura 15. Imágenes representativas de A-B) TEM y C) SEM de HA. Muestra la morfología de las nanopartículas de HA preparadas a pH 10.

Además, se puede observar en las imágenes de microscopia electrónica de transmisión (Figura15), que la síntesis a pH 10 empleando $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ presenta morfología característica de nanopartículas de HA.

Muestra M10:

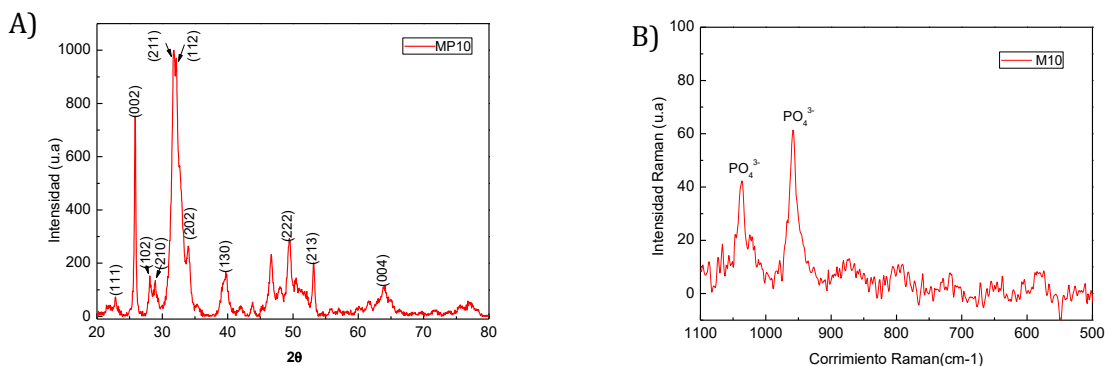


Figura 16. Muestra los resultados obtenidos empleando $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. a) Patrón de difracción de rayos X de HA. b) Espectro Raman de HA.

El patrón de difracción de rayos X (Figura 16a) muestra los principales planos cristalinos de la fase cristalina de HA, y como se puede observar, los picos están muy bien definidos. Por su parte, el espectro Raman muestra las frecuencias de los modos normales de PO_4^{3-} (Figura16b) que corresponden a 961.34 cm^{-1} (ν_1) y 1037 cm^{-1} (ν_3) de la HA.

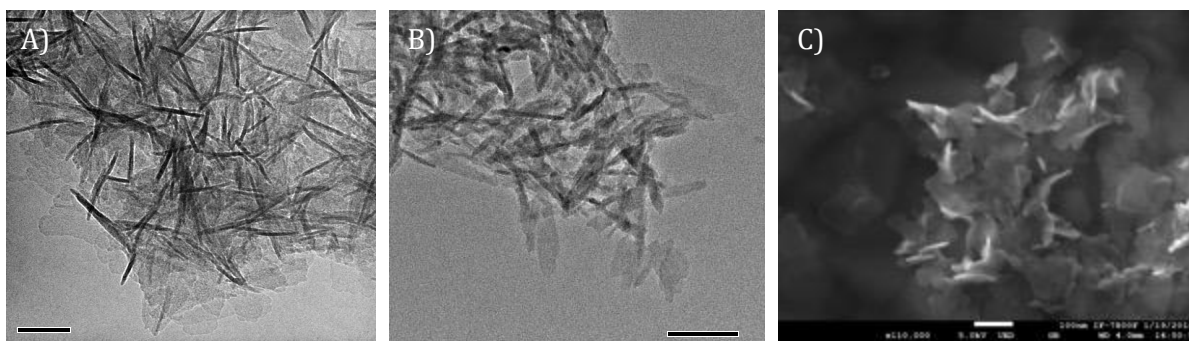


Figura 17. Imágenes representativas de A) TEM y B) TEM y C) SEM de HA

Se puede observar en las imágenes de microscopia electrónica de transmisión (Figura 17), que esta muestra presenta morfología característica de nanopartículas de HA.

3.2 Compósitos HA@PS-n y HA@PS-p

En el caso de los compuestos de silicio poroso, se usaron dos sustratos diferentes de Silicio Poroso, tipo n (HA@PS-n) y tipo p (HA@PS-p) para inducir la nucleación de cristales de HA a partir del método de coprecipitación, y para mostrar el posible proceso de cristalización/deposición de HA a temperatura ambiente.

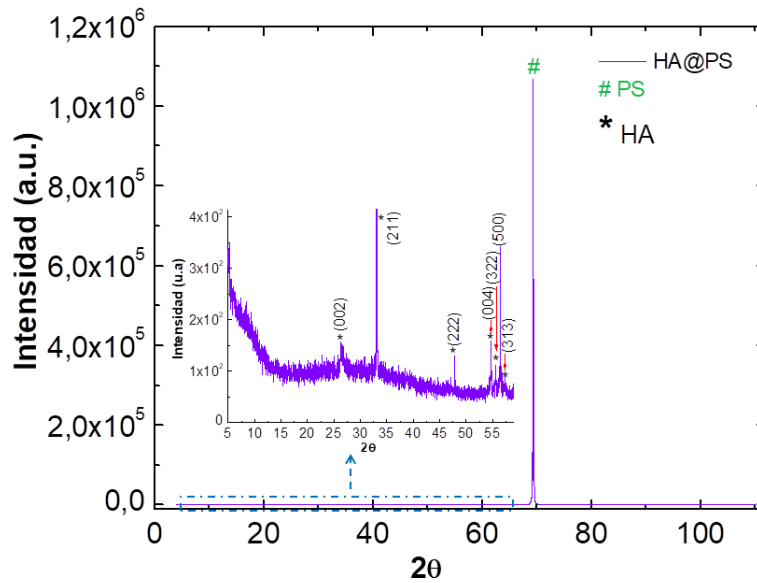


Figura. 18 Difractograma de rayos X del compuesto HA@SP-n.

Se analizó la pequeña placa denotada como HA@SP-n por DRX para identificar los planos cristalinos y poder descartar la presencia de otras fases. En el difractograma de la Figura 18 se muestra una ampliación de la zona de interés, donde se observa claramente la formación de las nanopartículas de HA de acuerdo con la tarjeta PDF #072-1243, los picos principales corresponden a los planos cristalinos (002), un pico ancho centrado a 32.5° que es una envolvente de picos solapados de los planos cristalinos (211), (300) y (202) característicos de HA. Aunque el tamaño del cristal individual es inferior a 100 nm con muchos cristales manométricos y orientados aleatoriamente en el sustrato de Silicio-n, la señal de rayos X muestra picos muy delgados. Además de la fase cristalina de HA, se observa el pico de Silicio característico en 69°.

Posteriormente se analizaron varias zonas en cada placa para obtener los espectros Raman, en el caso del compuesto HA@SP-n se midió con un láser de longitud de onda de 532 nm, con un tiempo de exposición de 10 s a una potencia de 3 mW. La Figura 19 (A, B) muestra dos espectros Raman representativos de todas las zonas que se midieron.

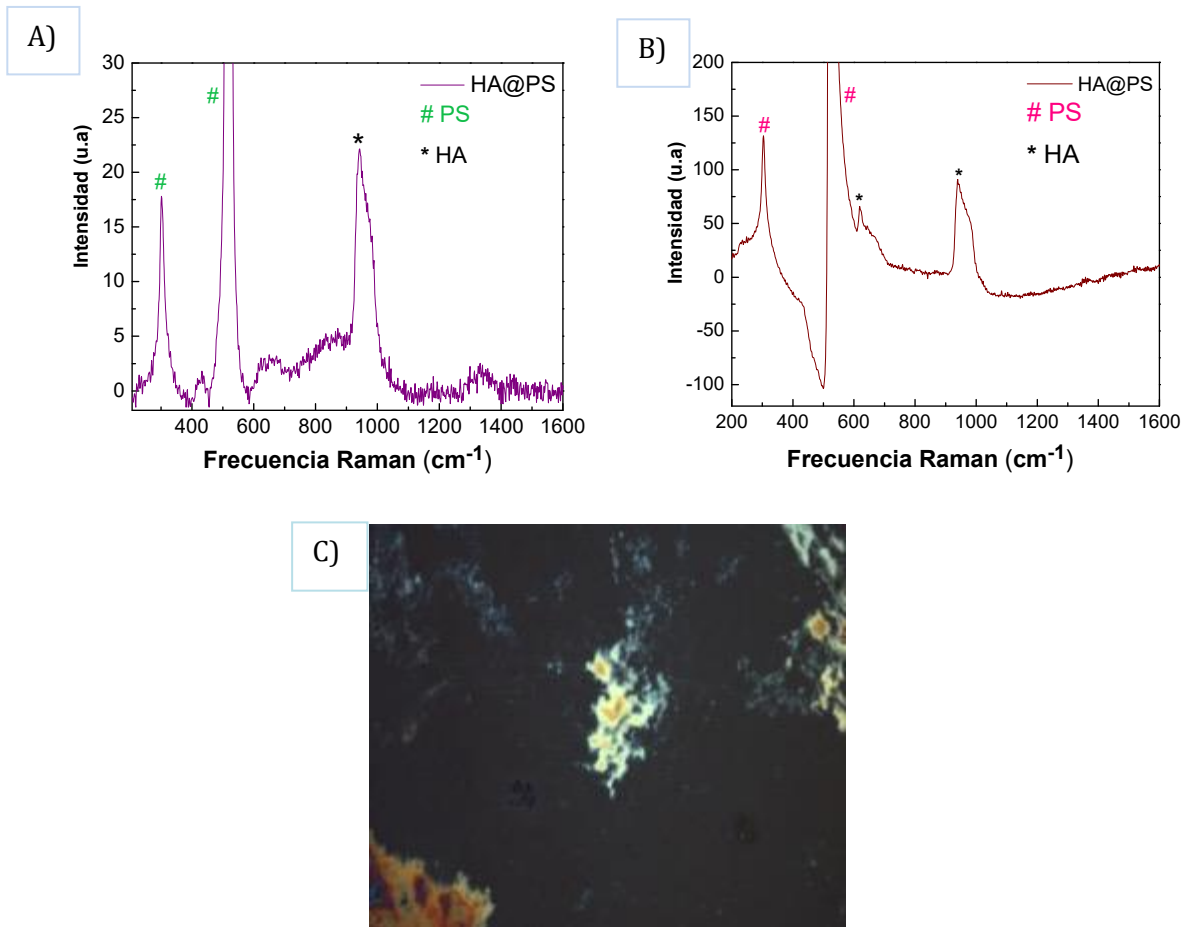


Figura. 19 (A,B) Espectros Raman del compuesto HA@SP-n, C) Imagen Óptica de la muestra HA@SP-n.

En el espectro Raman de la Figura 19A) se observa la frecuencia en 964 cm^{-1} que corresponde al modo Vibracional del grupo fosfato (PO_4^{3-}) ν_1 que generalmente es el pico más fuerte en el espectro de HA, para el caso de la Figura 18B) se observan dos señales representativas de HA, una en 590 y la otra en 961 cm^{-1} , que corresponden a los modos vibracionales del grupo fosfato ν_4 , ν_1 , respectivamente. En ambos espectros, figura 19A) y B), se observan las señales en 303.5 y 520 cm^{-1} correspondientes al Silicio cristalino [49].

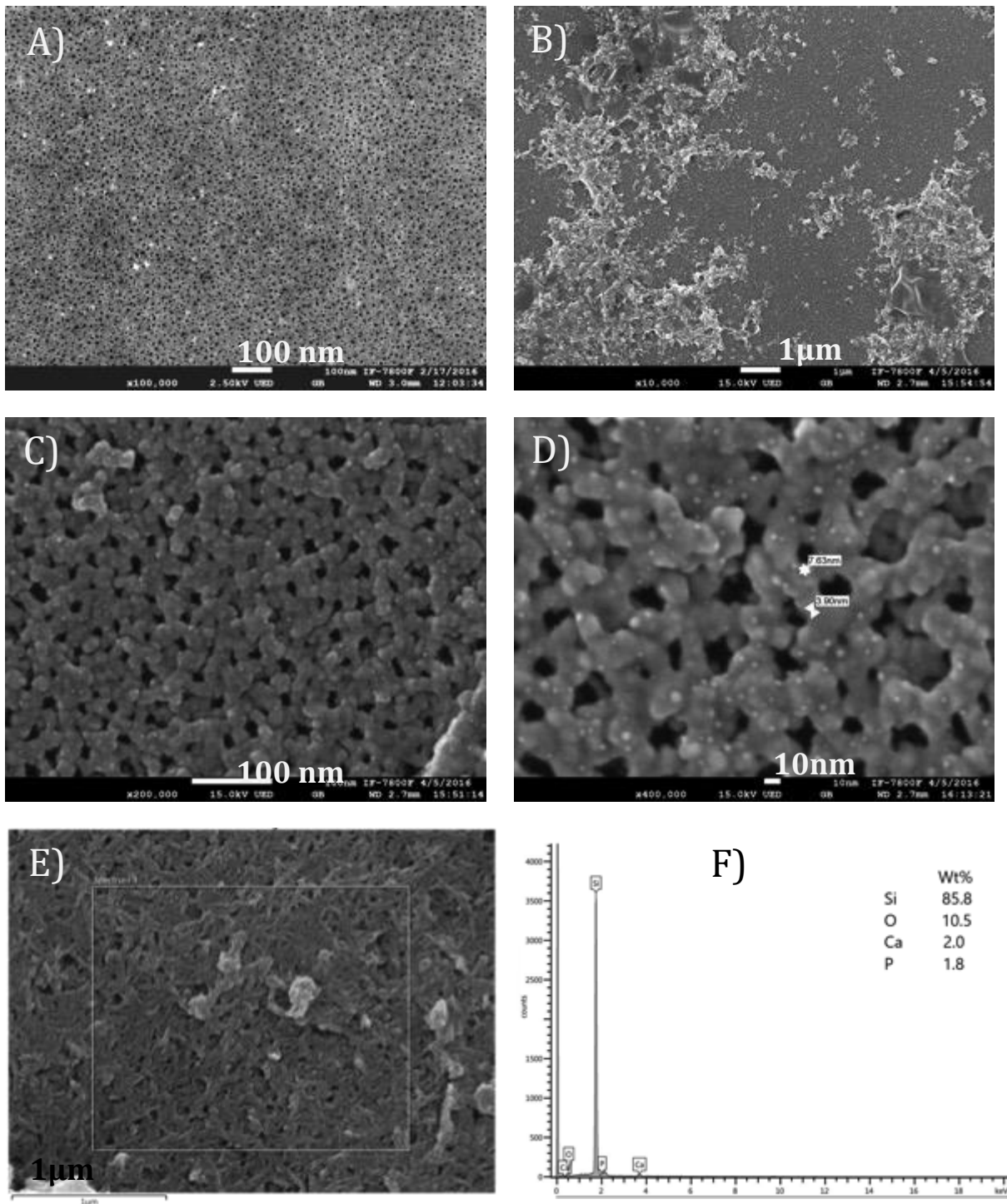


Figura 20. Imágenes SEM del compuesto HA@SP-n A) Silicio Poroso, (B-E) Silicio Poroso con HA a diferentes aumentos y "EDS" (F).

La Figura 20 muestra las imágenes SEM correspondientes a la muestra de HA@SP-n, en la Figura 20A) se observa la parte superior del sustrato de Silicio Poroso tipo n, y en la Figura 20B) se muestra la nucleación de HA así como la aglomeración en algunas

zonas del sustrato poroso después de realizar el proceso de coprecipitación que alcanzó una altura aproximadamente de $1\mu\text{m}$ con respecto a la superficie del SP. Debido al tamaño de poro (2 a 10nm) de la superficie de SP, no se logra una infiltración completa dentro de la matriz del SP. Morfológicamente, el crecimiento de partículas de HA en/sobre PS es similar a otras sintetizadas previamente [50]. Debido al aumento de la porosidad en el área donde la muestra está en contacto con la solución precursora, el crecimiento de hidroxiapatita es muy diferente en comparación con el área donde la solución se infiltra por capilaridad (ver Figura 20D). Esto indica que la técnica de coprecipitación es viable para formar un compuesto basado en HA y PS a temperatura ambiente.

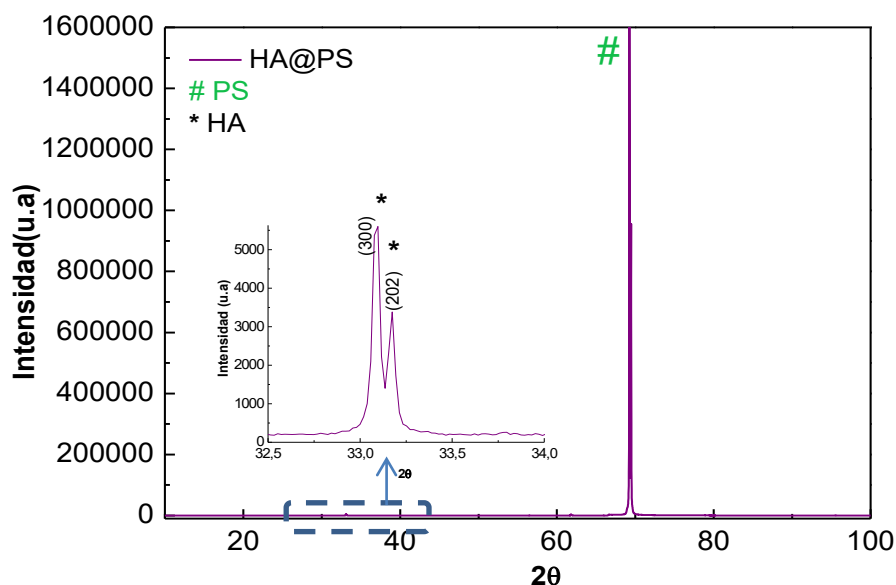


Figura 21. Difractograma de rayos X del compuesto HA@SP-p.

En la Figura 21 se muestra el espectro de difracción de rayos X del compuesto HA@SP-p, en el que se logra observar dos señales importantes de dos picos centrados en 33.5° , correspondientes a los planos cristalinos (300) y (202) de la fase de HA de acuerdo con la tarjeta PDF #072-1243, en este caso se hizo una amplificación del difractograma de esa zona, ya que la señal del silicio en 69° es mucho más intensa que la señal de la HA.

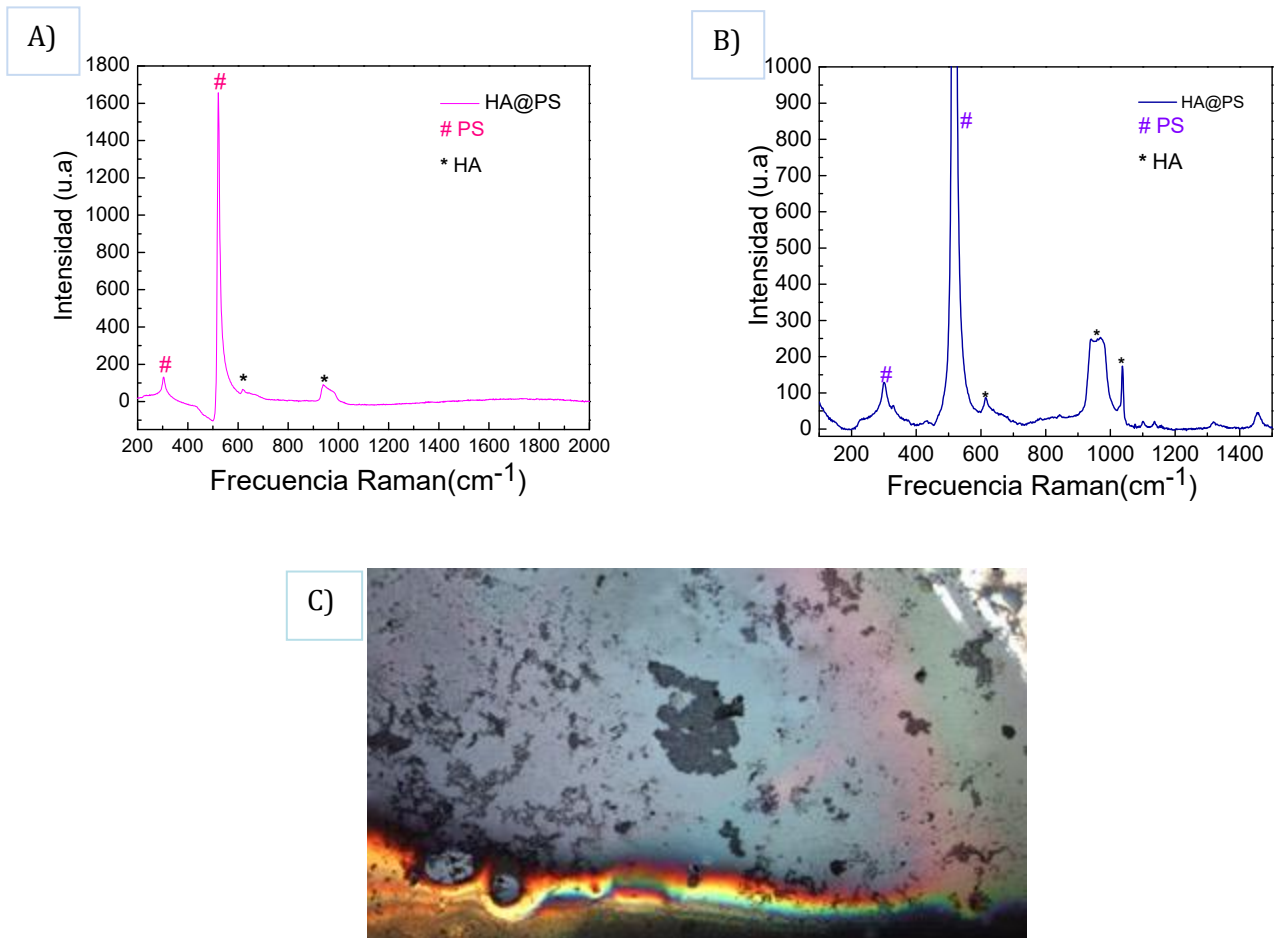


Figura 22. (A, B) Espectros Raman del compuesto HA@SP-p y C) Imagen Óptica de la muestra HA@SP-p.

La Figura 22 muestra los resultados Raman correspondientes al compuesto HA@SP-p, tomados en la zona mostrada en la Figura 22C) de la cual se tomaron varios espectros Raman y se eligieron dos representativos (ver figuras 22A) y B)). Para el caso del espectro de la Figura 22A) se observan dos señales características de HA en 610 y 945 cm^{-1} , la primera señal corresponde a la deformación P-O del grupo fosfato (PO_4^{3-}) ν_4 , y la segunda señal corresponde al balance simétrico P-O del grupo fosfato (PO_4^{3-}) ν_1 . Comparando con el espectro de la Figura 22B) se observan tres señales en 610, 945 y 1028 cm^{-1} correspondientes al modo Vibracional del grupo fosfato ν_4 , ν_1 y ν_1 respectivamente. Hay que hacer notar que en ambos espectros se observan las señales en 303.5 y 520 cm^{-1} asignadas al silicio cristalino [49].

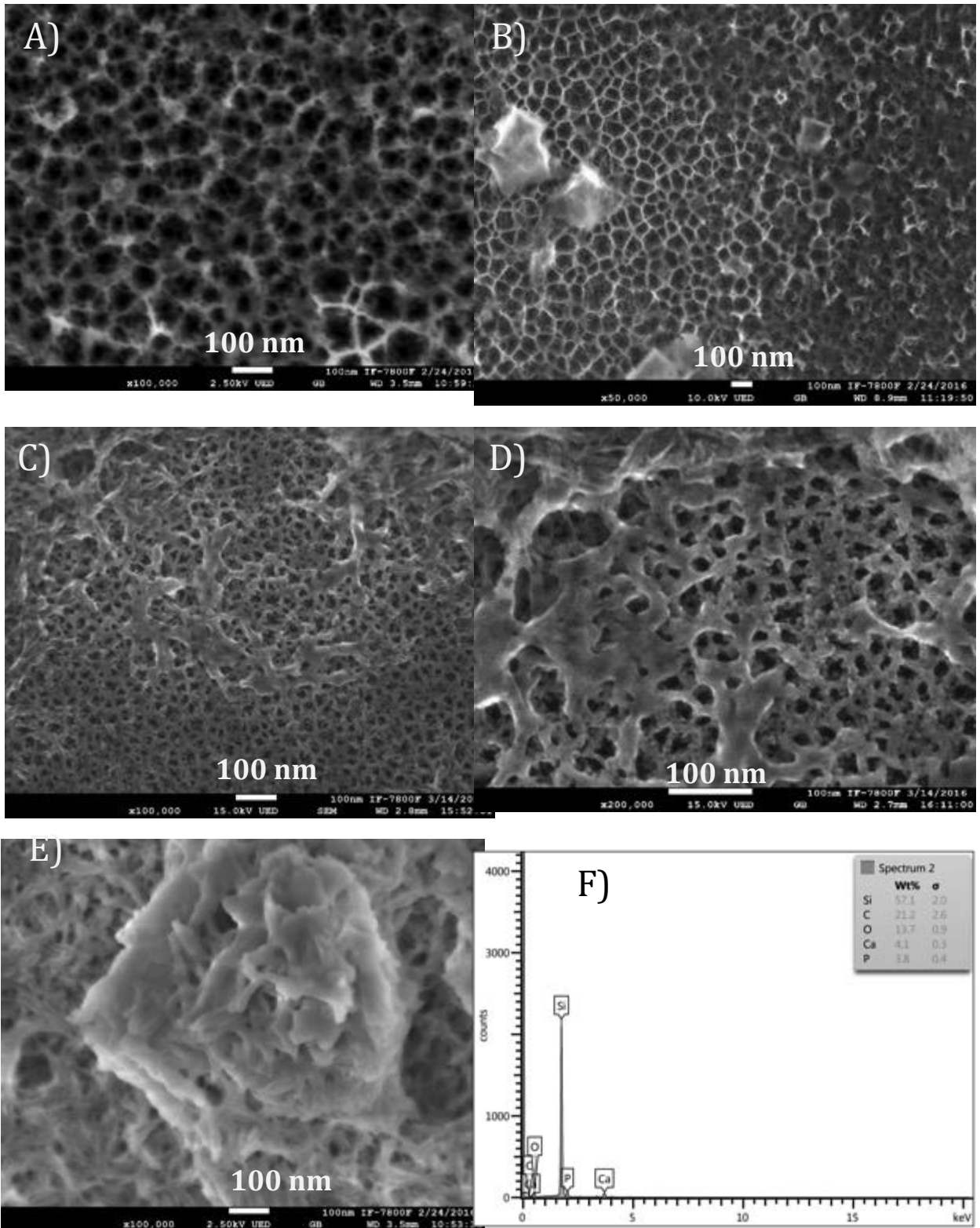


Fig. 23 Imágenes SEM del compuesto HA@SP-p, A) Silicio Poroso, (B-E) Silicio Poroso con HA a diferentes aumentos y F) "EDS".

Aunque las imágenes de SEM para el caso del compuesto HA @ PS-p muestran una morfología similar a la muestra HA @ PS-n, debido a la diferencia en la porosidad del sustrato, la nucleación en los poros es relativamente más eficiente que la estructura porosa tipo n. La Figura 23A) muestra la vista de la superficie del sustrato PS tipo p sin HA. Por su parte, la Figura 23B) muestra que la nucleación de HA formada mediante el método de coprecipitación consiste en aglomerados, que en algunas partes de la muestra alcanzan una altura de aproximadamente 2 μm con respecto a la superficie de PS. Debido a tamaño de macro poros (50-100 nm) en la superficie de PS, se obtuvo una infiltración parcial dentro de la matriz de silicio poroso. Además, la imagen de la Figura 23C) muestra que las partículas de HA son fibras interconectadas, de alrededor de 100 nm de espesor, y en algunas áreas en la plantilla porosa, las partículas están bien aglomeradas en pequeños grupos de aproximadamente 20 nm, como puede verse en las Figuras 23D y E).

3.3 Compósitos de Hidroxiapatita y Sustrato de Silicio poroso obtenido de una planta endémica Cola de Caballo (*Equisetum laevigatum*)

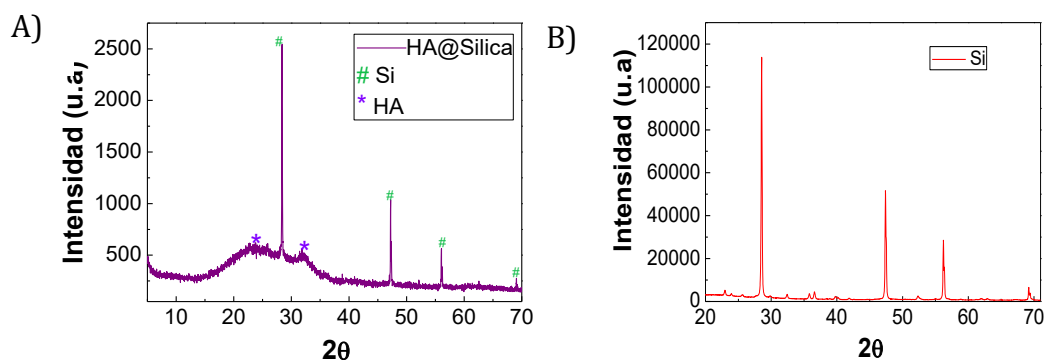


Figura 24. Difractograma de rayos X registrado para el compuesto A) HA@-Silicio-cc y silicio B) Silicio-cc.

La Figura 24 muestra los difractogramas de rayos X tanto del compuesto obtenido A)HA@-Silicio-cc (Silicio con cola de caballo), así como del sustrato empleado para la cristalización de HA, cuya indexación se llevó a cabo con la tarjeta PDF #026-1481 que corresponde a la fase cúbica de Silicio. En la Figura 24 A) es evidente que no se aprecian picos definidos por parte de los nanocristales de HA aunque comparando con

la Figura 24B) en la que se observa perfectamente la fase cúbica del Silicio, se logra ver en el intervalo de 20° y 35° de la Figura 24A) la contribución de la HA.

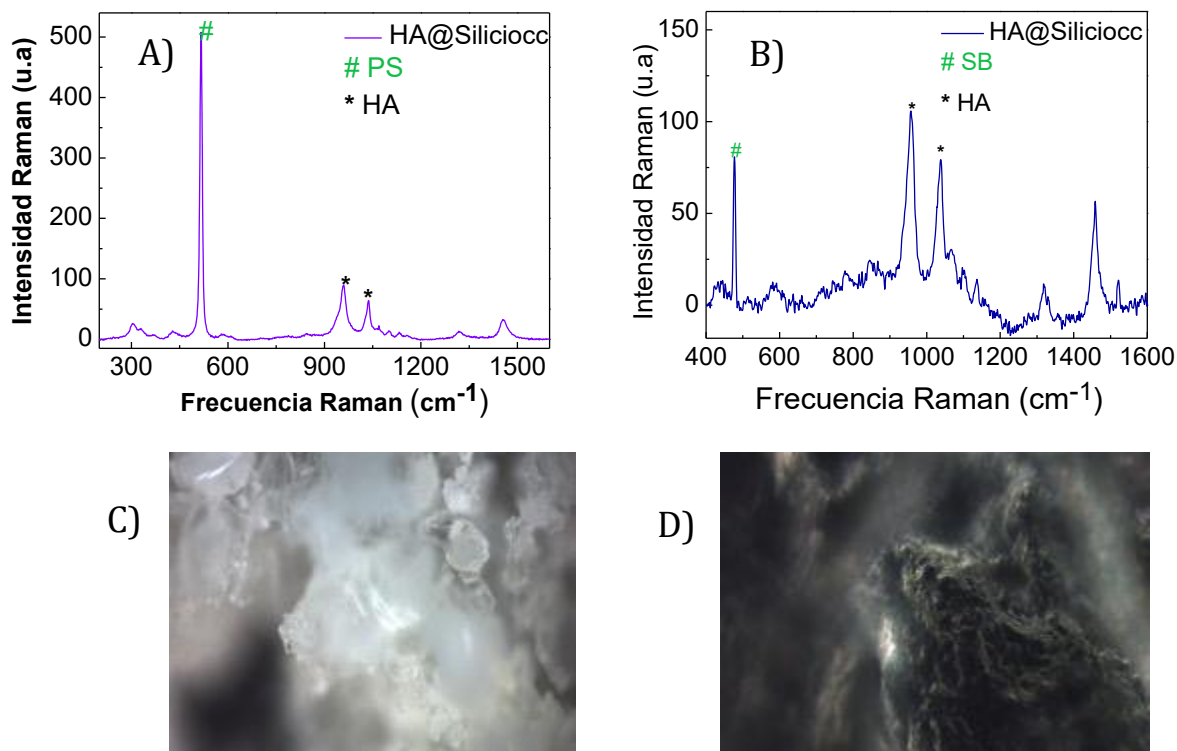


Figura 25. A,B) Espectros Raman del compuesto HA@-Silicio-cc. C, D) Imágenes ópticas del compuesto.

Por su parte, los espectros Raman de la Figura 25 fueron tomados de dos muestreos del compuesto HA@-Silicio-cc, donde las señales en 959 y 1040 cm^{-1} de la Figura 25A) se deben al estiramiento simétrico del grupo fosfato (PO_4^{3-}) ν_1 que corresponden a la HA y el que se ve en 519 cm^{-1} corresponde al Silicio. En el caso de la Figura 25B) las señales que corresponden al grupo fosfato debido a la presencia de nanocristales de HA se encuentran en 960 y 1044 cm^{-1} y la señal en 497 cm^{-1} corresponde a Silicio.

La Figura 26 muestra imágenes de SEM de HA así como del compuesto HA@-Silicio-cc. La Figura 26A) muestra únicamente la estructura de HA en la cual se observan estructuras alargadas en forma de agujas muy característico del crecimiento en HA, donde podemos observar gracias a las imágenes B,C y D) que sí se presentaron cambios en la morfología de HA después de que esta crece en presencia de Silicio Poroso en polvo, ya que se observa una matriz porosa y en ella pequeños granos

aciculares que corresponden a la HA ya que podemos observar del análisis elemental la composición ésta y en los mapeos D y F) como están distribuidos en la matriz de Silicio.

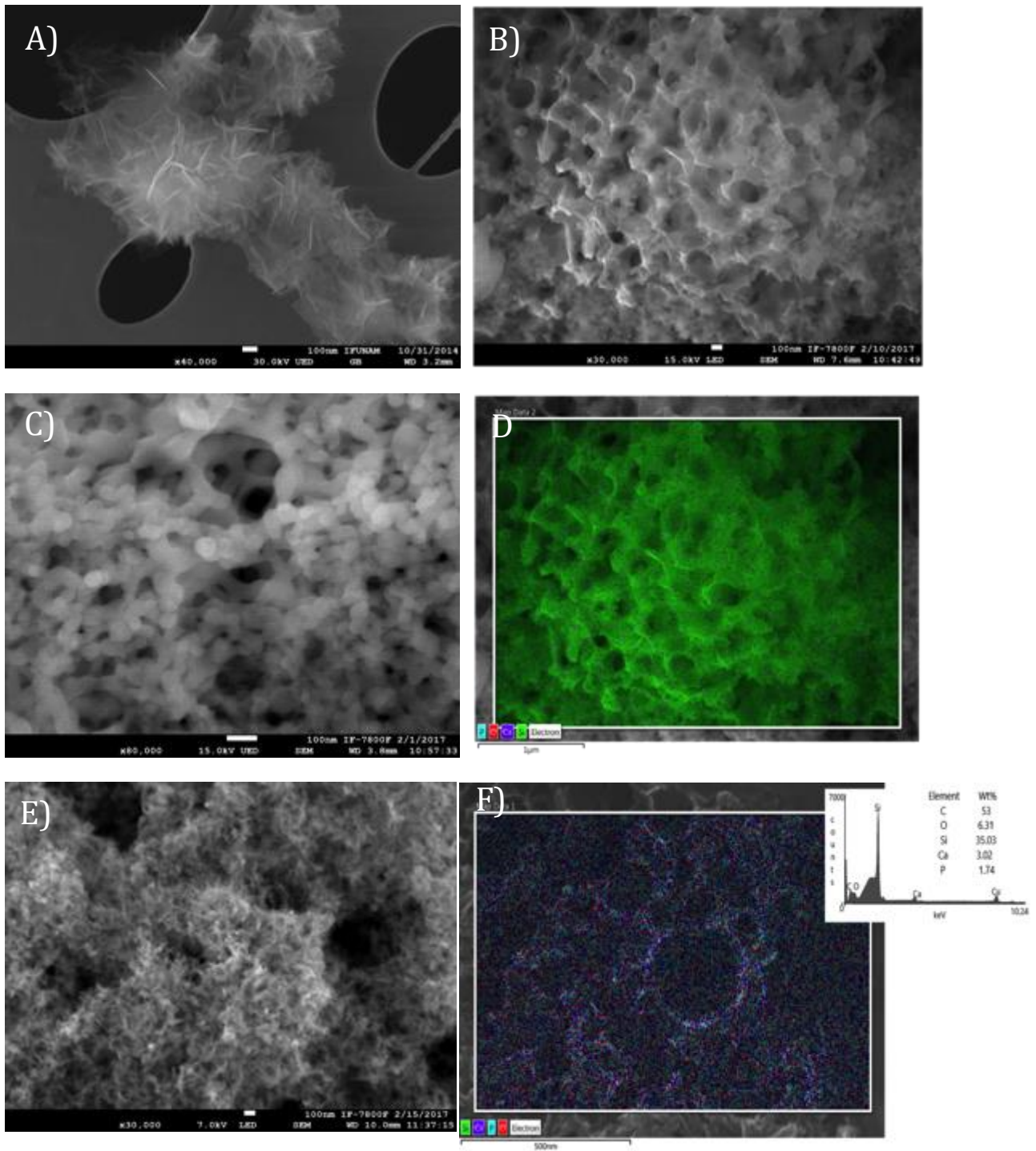


Figura 26. Imagen de MEB de A) HA, B-F) compuesto HA@-Silicio-cc con su respectivo “EDS” y mapeos.

De la misma forma, se empleó el TEM convencional y de alta resolución para analizar las características estructurales que presenta el compuesto en polvo, como se puede ver en la Figura 27 donde se muestra una selección de los resultados obtenidos.

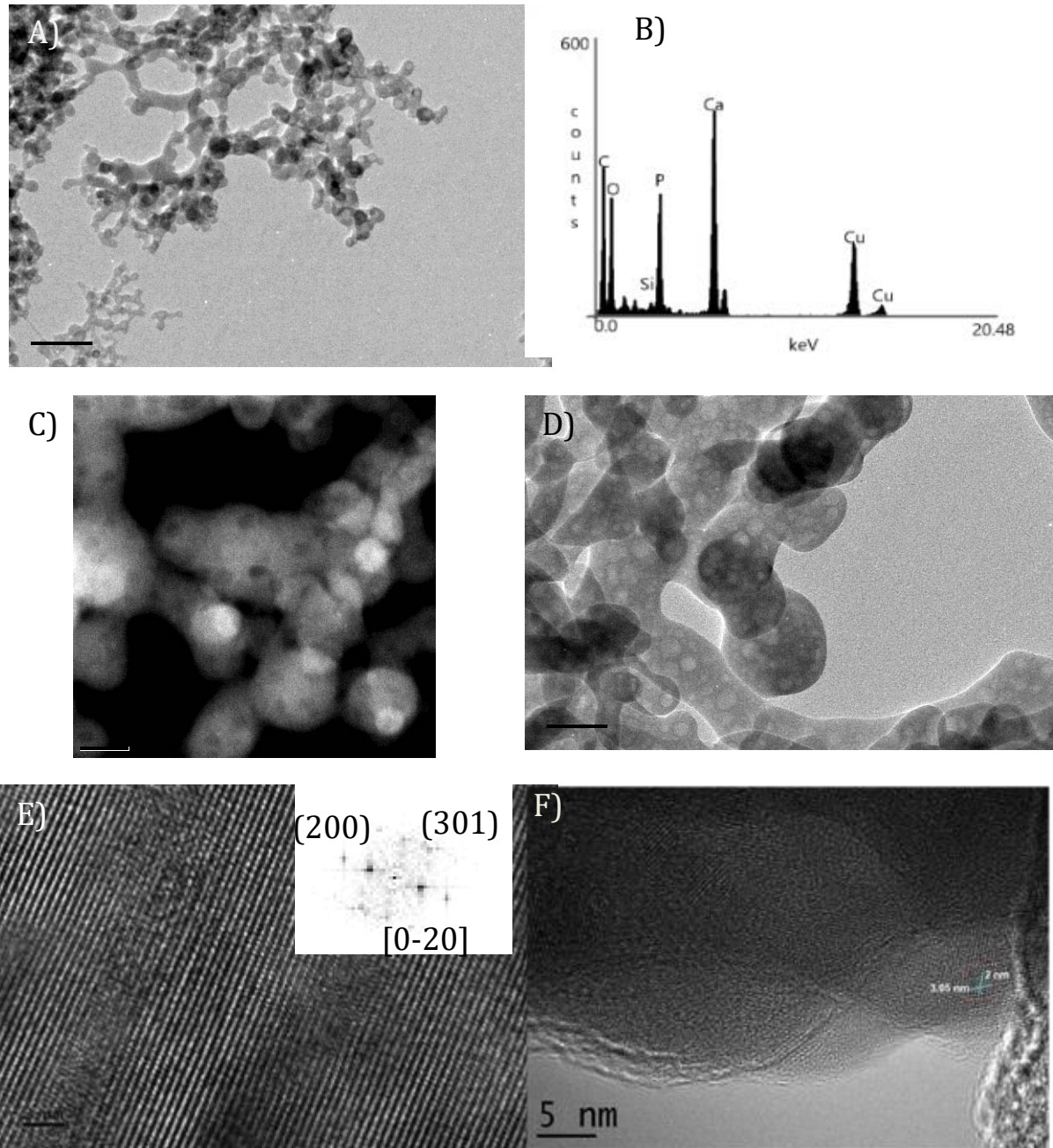


Figura 27. Imagen de TEM de A-E) del compuesto HA@-Silicio-cc con su respectivo "EDS".

En la Figura 27 se muestran imágenes de TEM campo claro A, D, E y F) y en C) campo oscuro con el correspondiente análisis EDS B). La FFT en la parte superior de la Figura 27E) nos ayudó a determinar que la imagen se encuentra en el eje de zona [0-20] de la HA. Por su parte, del recuadro marcado en la parte inferior derecha de la Figura 27F), se encontró que los planos que se observan corresponde a los planos (111) y (220) de la fase del Silicio Cúbico.

3.4 Compósito Péptido@Hidroxiapatita

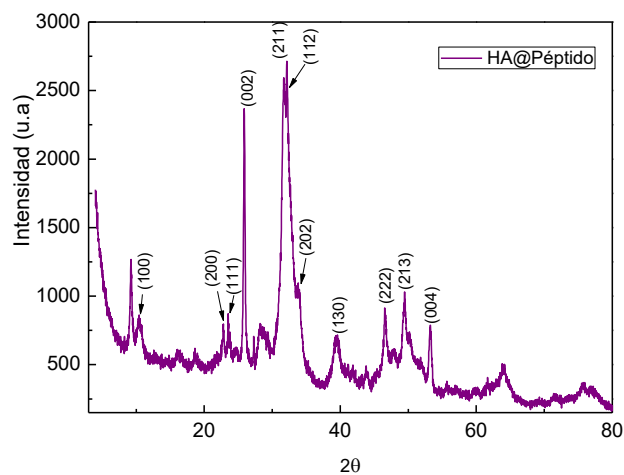


Figura 28. Patrón de difracción del compuesto Péptido@Hidroxiapatita.

El patrón de difracción de rayos X de la Figura 28 muestra la fase de HA con celda hexagonal sin la presencia de otras fases, es importante mencionar que el pH de esta muestra fue de 7, lo que es de gran importancia ya que es un compuesto con pH muy cercano al fisiológico lo que podría favorecer su aplicación en un organismo vivo.

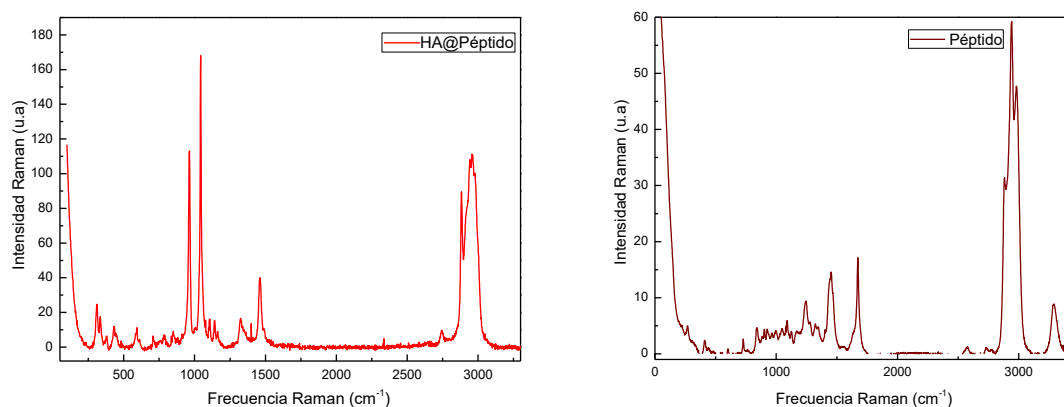


Figura 29. A) Espectro Raman del compuesto Péptido@Hidroxiapatita. B) Espectro Raman del péptido.

Además, podemos observar en el espectro Raman del péptido Figura 29 B) que se trata de una molécula bastante hidroxilada por la presencia de la banda intensa en el intervalo de 3000 cm^{-1} , donde se observan, Figura 29 A) Las frecuencias de los modos normales en 957 cm^{-1} de PO_4^{3-} (ν_1) y en 1045 cm^{-1} de PO_4^{3-} (ν_3) correspondientes a la señal de la HA; además de las señales del péptido en el intervalo 1455-1465 cm^{-1} que corresponden con la deformación CH_2 [51].

Por otro lado, se analizaron las muestras del compuesto por SEM para observar si se presentaron cambios en la morfología del material después de haber usado el péptido en la síntesis de HA. Para ello se tiene en la Figura 30 A) imágenes de HA sola; Figura 30 B) imágenes del péptido solo y Figura 30 C) imágenes de Péptido@HA.

Se encontró que de forma general los granos de HA no presentaron cambios significativos ya que aunque se observan estructuras en forma de agujas en HA también se observan estructuras aciculares embebidas en las estructuras irregulares del péptido.

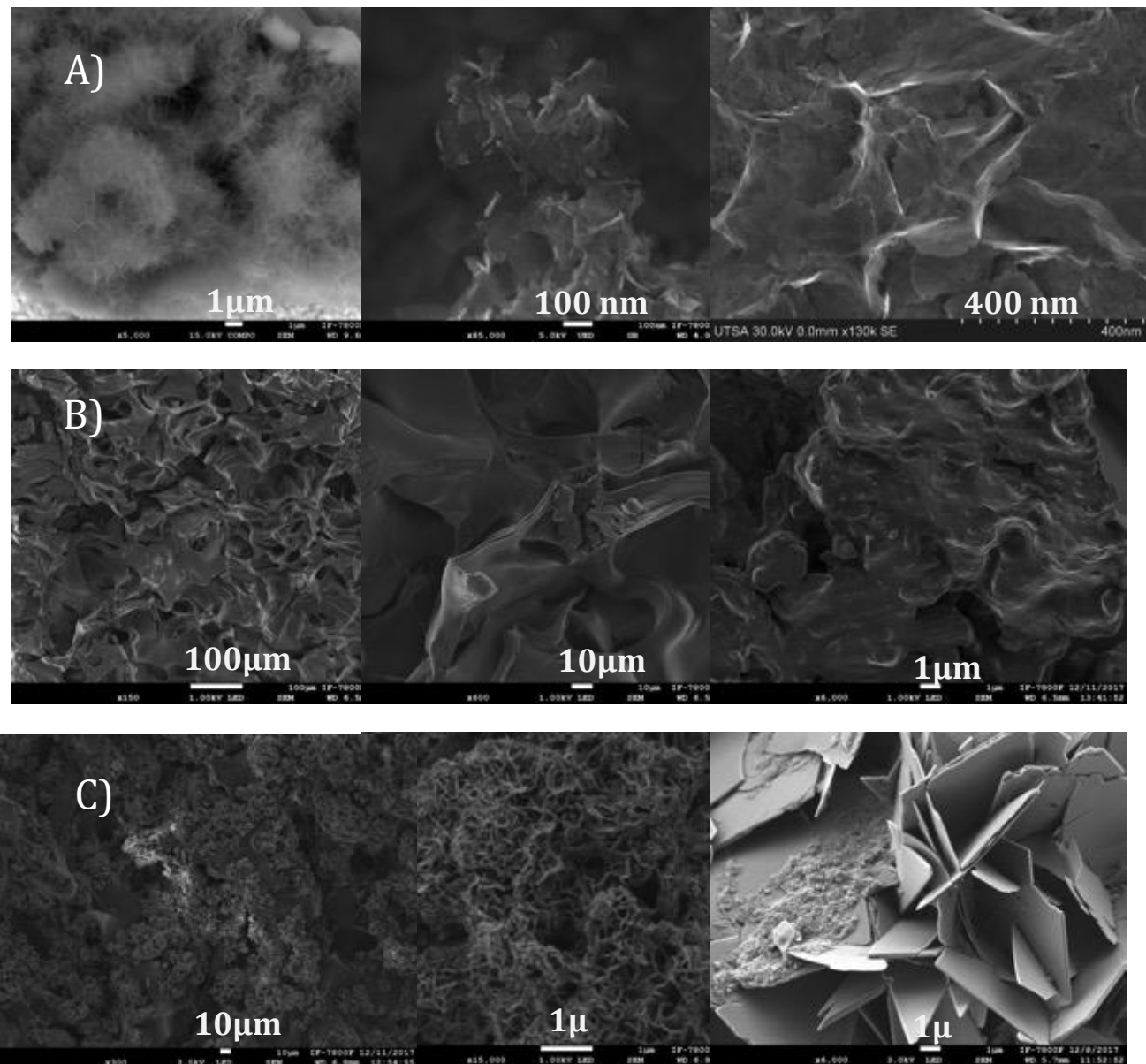


Figura 30 Imágenes de MEB A) del polvo HA. B) Imágenes del péptido. C) Polvo Péptido@HA.

CAPÍTULO 4



ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para ver si se ha cumplido con las tres etapas planteadas para este trabajo, se realizó el análisis de los resultados presentados en el capítulo anterior, donde tratamos de comprender aquellos puntos que consideramos son de gran importancia y que vale la pena resaltar de lo obtenido a lo largo de este trabajo.

ETAPA I) Sintetizar la Hidroxiapatita a temperatura ambiente.

La composición química de la HA hexagonal (grupo espacial $P6_3/m$) es $\text{Ca(I)}_4\text{Ca(II)}_6(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, siendo su configuración atómica local la que se muestra en el esquema de la Figura 31A). El sitio de Ca (I) está rodeado por seis PO_4^{3-} de forma tetraédrica Figura 31B) a su vez coordinado por nueve iones oxígeno. Además, el sitio de Ca (II) tiene siete coordinaciones con seis iones de oxígeno del grupo PO_4^{3-} y un ion de oxígeno del grupo OH-.

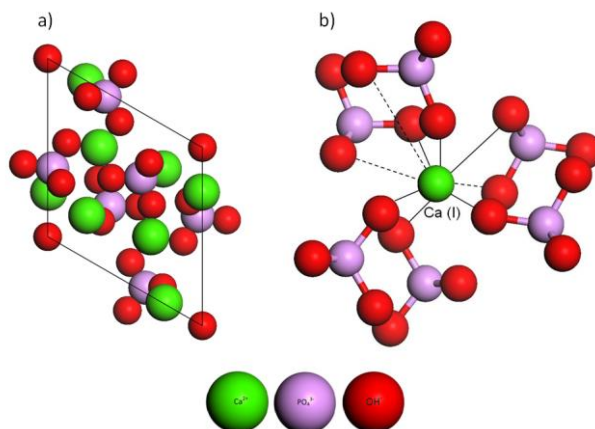
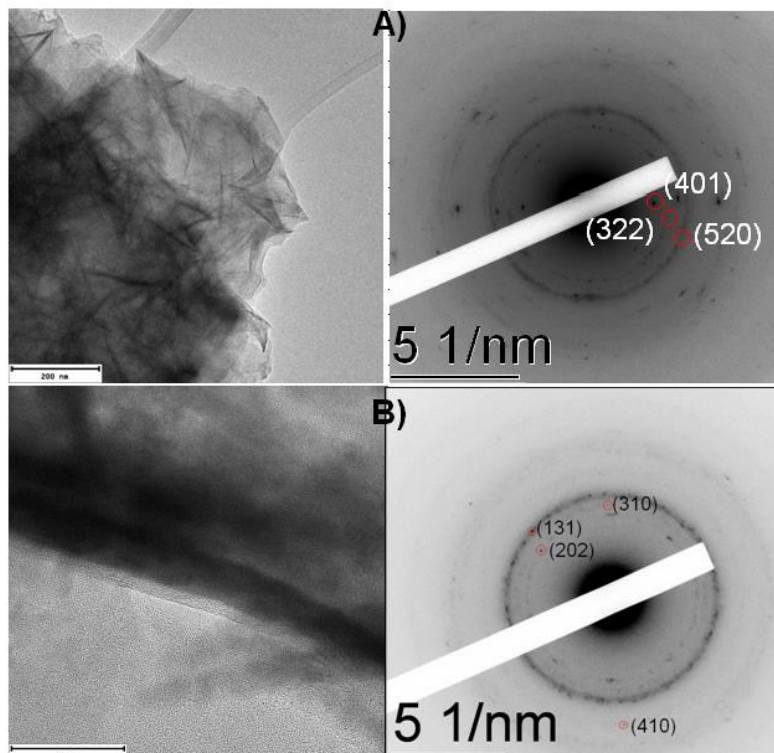


Figura 31. A) Estructura del cristal HA visto a lo largo del eje-c [47,60].

En este trabajo se determinaron las condiciones necesarias para la obtención de HA a temperatura ambiente. A diferencia de los resultados reportados por Nagaprasad y Amita [46], después de la mezcla en solución, ellos elevaron la temperatura a 80 °C como paso final para la obtención del polvo que posteriormente caracterizaron, mientras que nosotros congelamos la solución abruptamente con nitrógeno líquido (aproximadamente 77 °K) para detener la síntesis y poder obtener el polvo que se caracterizó.

Además en este trabajo se empleó ácido tánico como un agente quelante, el cual hace que se forme un complejo estable con iones Ca^{2+} especialmente en condiciones ácidas, y posteriormente se hace un tratamiento alcalino para proporcionar al medio de reacción condiciones para la formación de núcleos de tamaño suficiente para que estas crezcan hasta llegar a la sobresaturación, para finalmente llegar a la forma estable de la fase de la HA. El ácido tánico al ser una molécula grande, juega un papel importante en la modificación del tamaño de partícula y morfología de la HA.

Se pudo comprobar que efectivamente teníamos hidroxiapatita ya que a partir de los resultados de TEM con lo que se analizó cada muestra compuesta por varios cristales pequeños orientados aleatoriamente, se obtuvieron patrones de difracción de anillos, ver Figura 32, cuyos diámetros corresponden al espaciado existente entre los planos atómicos del cristal de HA.



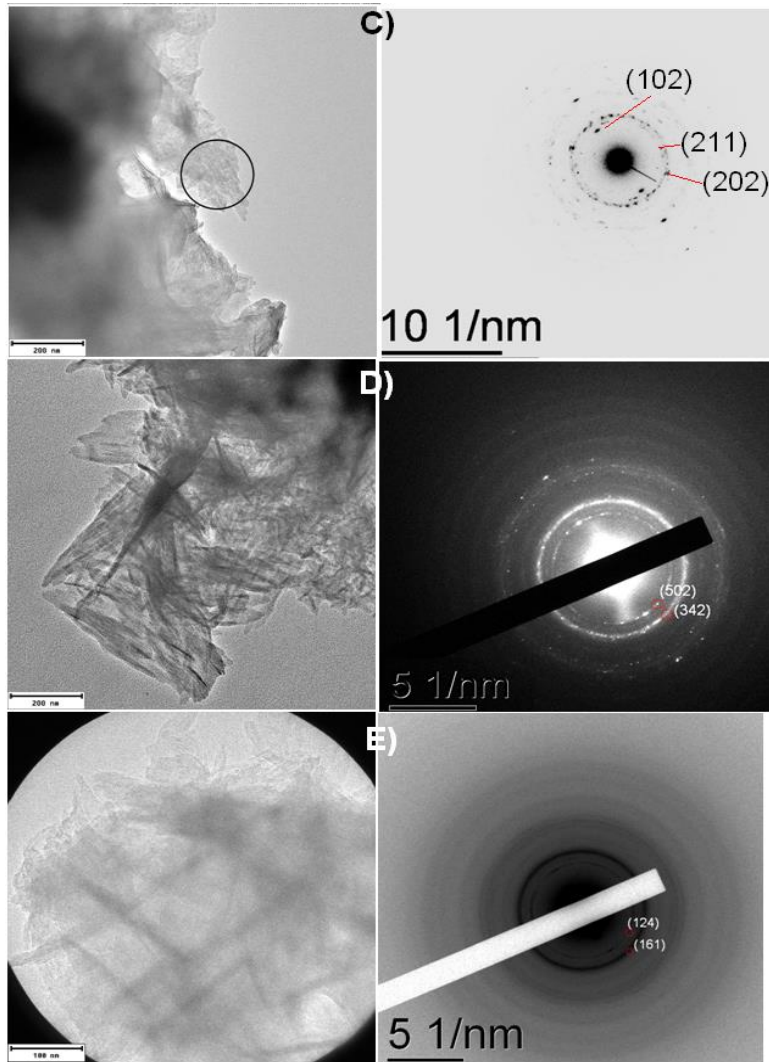


Figura 32. Patrón de difracción de anillos de las muestras: A) MP3, B) MP4, C) M8, D) M9, E) M10

Esto se puede comparar con las indexaciones por DRX, todos los picos son indexados con los índices (hkl) correspondientes a la tarjeta PDF 0721243, la cual contiene todos los datos cristalográficos de la fase hexagonal HA. Es importante hacer notar que en ningún difractograma de las Figuras 8A), 10 A), 12 A), 14 A), 16 A) existe otra fase estable, por mencionar el fosfato octacálcico (OCP; $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), ya que algunos trabajos reportan que OCP es una fase metaestable de HA [52], y de acuerdo al trabajo de Arellano [53] se corrobora la obtención de HA debido a que en todos los difractograma no aparece ningún pico ubicado en el valor 2θ igual a 4.7 característico de la fase OCP. Por otro lado, la Tabla 2 muestra el análisis de los espectros Raman que se obtuvieron en cada muestra. Lo que podemos observar es que no existe un cambio

significativo en las posiciones de las bandas al usar dos sales distintas de calcio para la síntesis de HA ya que se encuentran en el intervalo de 950-965 cm^{-1} correspondiente a la vibración de valencia simétrica $[(\text{PO}_4)^{3-}(\nu_1)]$; 1030-1045 cm^{-1} a la vibración de valencia asimétrica $[(\text{PO}_4)^{3-}(\nu_3)]$ y en 585 cm^{-1} la deformación P-O $[(\text{PO}_4)^{3-}(\nu_4)]$ [51, 54-57].

Cabe resaltar que es más confiable trabajar con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ya que el ion nitrato (NO_3^-) es de mayor tamaño que el ion cloruro (Cl^-), y si no se trabaja en condiciones adecuadas de concentración, este podría sustituir sitios del ion hidroxilo (OH^-) generando vacancias.

Sal	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$			CaCl_2	
	M8	M9	M10	MP3	MP4
ν_1	956.20	959.71	961.34	958.83	960.27
ν_3	1044.46	1046.46	1037.56	1045.34	
ν_4	-	-	-	586.50	-

Tabla 2. Líneas del espectro Raman de HA obtenidas en las muestras.

De acuerdo con cada espectro EDS tomado sobre cada muestra siempre se observó un pico de Ca a energías superiores al pico de P y de mayor intensidad. A partir de esta técnica no es posible determinar con precisión la relación molar Ca/P debido la falta de calibración del instrumento. A pesar de esto un análisis semicuantitativo arrojó una relación $\text{Ca/P} = 1,57$ (Ca/P teórica= 1,67) lo que sugiere que la reacción de síntesis propuesta al inicio de este trabajo empleando ácido tánico como un agente quelante y dos sales de calcio para la formación de $\text{HA}(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ se completó exitosamente.

Etapa II) Construir un compósito HA@SP.

Ahora bien de acuerdo con los resultados obtenidos, en cada compósito tenemos el análisis de Raman y XRD revelando los picos de fosfato característicos y la naturaleza policristalina respectivamente. La forma y el tamaño de los poros en cada caso de Silicio fueron favorables para la adhesión y el crecimiento de la HA. Cabe mencionar que el proceso de síntesis fue más rápida empleando sustratos en el medio de reacción, es decir se logró obtener la fase de la HA en menos de cuatro horas, que lo reportado en la literatura, esto es debido a que la velocidad de nucleación heterogénea es mayor que la nucleación homogénea de la superficie existente en este caso, ya que la presencia de Silicio Poroso (oblea y Silicio Poroso que se obtuvo de cola de caballo) en el medio de reacción así como del péptido, reducen el costo de la formación superficial y la barrera de nucleación es menor [58].

En el caso del péptido como observamos en el análisis Raman, se trata de una molécula con bastantes sitios OH⁻ por lo que este es un caso de nucleación mediante ion inducido, las fuerzas electrostáticas aumentan la interacción entre el centro de nucleación (en este caso el péptido) y las moléculas nucleantes, y a su vez la barrera de nucleación es menor que en la nucleación homogénea obtenida en todos los casos de la HA.

Ya que en ambos casos de los sustratos de Silicio el análisis de rayos X no es posible observar todos los picos de la fase de HA, si es posible hacerlo por espectroscopia Raman, sin embargo, esto no ocurre con el sustrato péptido ya que por rayos X se distingue perfectamente la fase de HA sin la presencia de otra fase. En general la banda de fosfato ν_1 es una superposición de las tres componentes del grupo fosfato (ν_1 , ν_3 , ν_4); por lo general tiene una forma asimétrica debido a la contribución de las vibraciones del fosfato desordenado y de HA no sustituida.

La Tabla 3 muestra el análisis de cada espectro en los diferentes compósitos. Se puede observar que para el caso de los compósitos HA@PS-n y HA@PS-p las dos señales obtenidas de cada compósito n y p se encuentran en el intervalo entre 945-955 cm⁻¹, y de acuerdo con la literatura, esto indica la presencia de un desorden del grupo fosfato en la red cristalina de la apatita y además, no se encuentra sustituida por el ion CO₃²⁻,

el mismo comportamiento se observa en el Silicio Poroso obtenido de la Cola de Caballo (HA@Sic-c)[51, 59,61], este comportamiento no se observa en el Péptido@HA ya que la señal no se encuentra en este intervalo, por lo que se infiere que en el compósito Péptido@HA se obtiene una estructura bastante ordenada.

Compósito	HA@PS		HA@Sic-c		Péptido@HA
	n	p			
Vibración (cm ⁻¹)					
V ₁	945,955	952,964	949,	959	960

Tabla 3. Líneas del espectro Raman de los diferentes compósitos.

Etapa III) Explorar una posible aplicación.

Como se mencionó anteriormente uno de los objetivos de este trabajo de tesis consistía en la elaboración de compósitos para una posible aplicación biológica, para lo que se trabajó en colaboración en un proyecto de regeneración ósea, ya que como sabemos, dos de los principales constituyentes del hueso son las fibras de colágena y los cristales de HA.

Esta colaboración se está llevando a cabo gracias al trabajo que realizan el M.C Rodrigo Correa y Dr. Elias Nahum, ambos alumnos del Dr. Higinio Arzate de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Odontología de la UNAM, quienes se encuentra realizando una investigación para regeneración ósea empleando péptidos. La idea principal fue ver si era posible obtener HA utilizando diez veces menos la concentración de todos los reactivos empleados para la síntesis de HA en condiciones ambientales usando un péptido con el que el M.C Rodrigo Correa ha venido trabajando para la obtención de HA y en cuyo caso si se obtiene HA pero en cantidades pequeñas.

Posteriormente de ser posible al obtener la fase HA evaluar la actividad del compuesto final en un defecto crítico en calvarias de rata.

Una vez que se identificó la fase de HA, gracias a la experiencia de la Dra. Fabiola Salgado y M en C. Sonia López, se operaron 15 ratas implantando los andamios en el defecto crítico que se realizó en calvaria de cada rata. Por lo cual se emplearon 3 grupos de ratas cuyos andamios contenían: únicamente el péptido (5 ratas), únicamente HA (5 ratas) y el compuesto Péptido@HA (5 ratas).

Después de un mes las ratas se sacrificaron para realizar el análisis histológico de cada grupo. La Dra. Sonia López después de armar las laminillas pudo obtener un diagnóstico para cada grupo con los andamios.

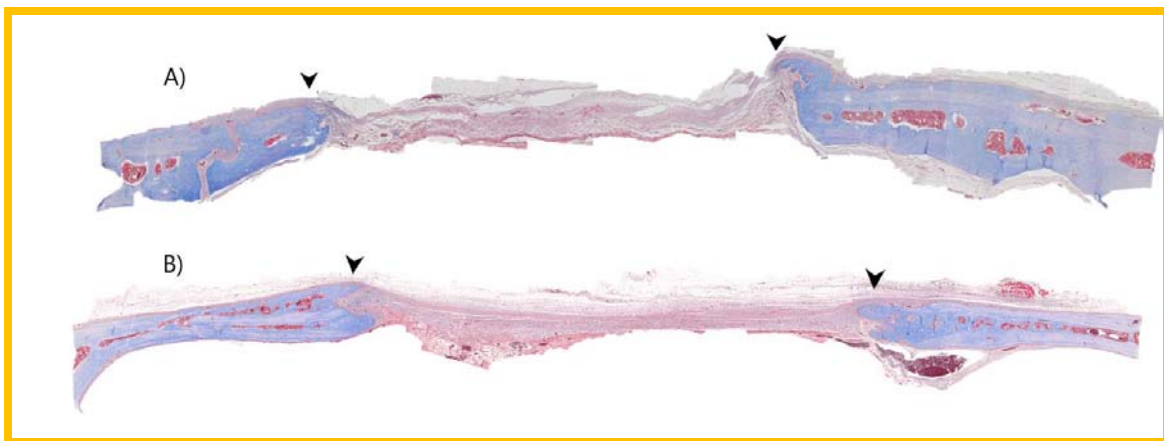


Figura 34. Secciones histológicas después de 30 días de tratamiento: A) HA y B) péptido.

Una imagen representativa de los resultados con los dos primeros andamios pueden verse en la Figura 34, donde el defecto experimental fue tratado con un andamio GELFOAM embebida con A) HA y B) péptido. Los cortes histológicos se encuentran conformados por tejido conjuntivo denso bien vascularizado y mezclado. Se encuentra infiltrado tejido inflamatorio crónico moderado, se observan dos zonas que presentan un material basófilo rodeado de células epiteliales y gigantes multinucleadas tipo Touton a cuerpo extraño.

La Dra López determinó que el diagnóstico para este caso era: Granulomas a cuerpo extraño.

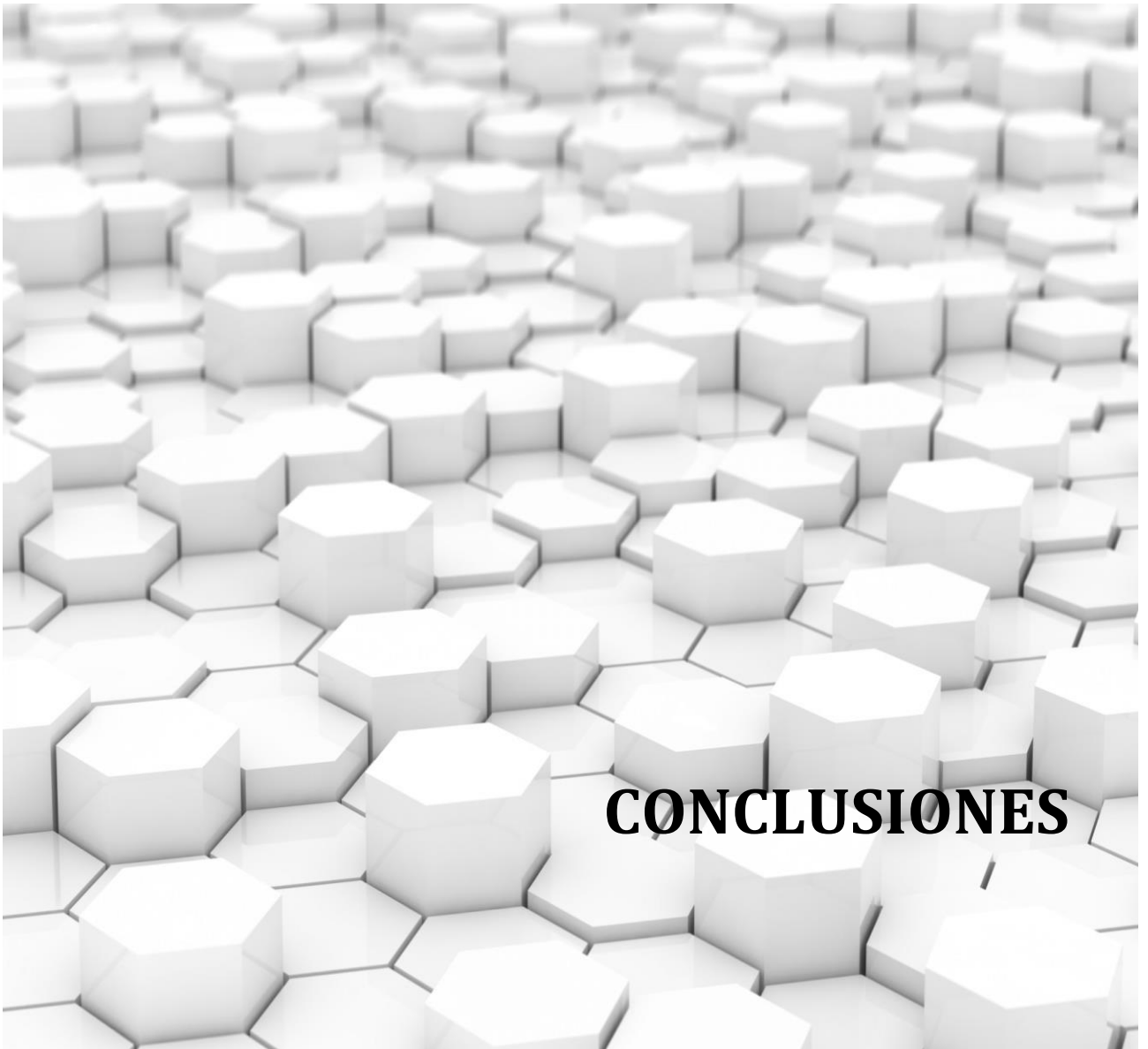


Figura 35. Secciones histológicas después de 30 días de tratamiento con Péptido@HA.

En la Figura 35 se muestra una imagen del correspondiente resultado con el andamio GELFOAM embebida con Péptido@HA. Los cortes histológicos muestran la formación ósea, conformados por bandas de colágena densa y laxo, muy vascularizado. Se observa infiltrado inflamatorio crónico, severo y difuso linfocitario con presencia de macrófagos con citoplasma de aspecto espumoso. Se observa una zona con material basófilo rodeadas de células epiteliales y gigantes multinucleadas tipo cuerpo extraño. En este caso, se determinó que el diagnóstico corresponde a: Inflamación crónica y granulomas a cuerpo extraño.

Por lo que de acuerdo a la información analizada, el comportamiento del compuesto evaluado logró su objetivo, la colágena densa es el primer paso durante el proceso de la regeneración total del hueso, pero dado el diagnóstico, este efecto se atribuye a la señal que se detectó en el análisis Raman ya que se observa una banda en 1099 cm^{-1} indicando una ligera sustitución del ion OH^- por el estado hidratado del ion CO_3^{2-} tipo A[51], en particular en este tipo de sustitución el cuerpo no la reconoce ya que existe una sustitución del mismo ión llamada tipo B y que se encuentra en diferente región en el espectro Raman y es similar a la hidroxiapatita de un hueso. Esto abre un camino en la investigación al sintetizar HA ahora con el objetivo de obtener principalmente un producto con contenido predominante de carbonato tipo B en la estructura de HA, ya que esto es muy similar al tejido del hueso.

CAPÍTULO 5



CONCLUSIONES

Como se mencionó al principio de este trabajo, se planteó un objetivo y una serie de metas a cumplir, todas ellas divididas en tres etapas a desarrollar. Ahora podemos asegurar que las dos primeras etapas se cumplieron totalmente con lo que se puede decir que se cumplió en su totalidad el plan de trabajo, y la tercera, si bien se pudo iniciar con excelentes resultados hasta la fecha, está inconclusa y deberá de continuarse hasta que se obtengan los resultados necesarios para determinar la completa valía de la hidroxiapatita obtenida por este método.

Por todo lo anterior, podemos decir entonces que con base al objetivo y metas planteadas en este trabajo se puede concluir lo siguiente:

- 1.- Se implantó un método de síntesis y se encontraron los parámetros adecuados para la obtención de cristales de hidroxiapatita a temperatura ambiente.
- 2.- Se observó que el ácido tánico que se utilizó como un agente quelante, jugó un papel importante en el tamaño de las partículas y morfología de la Hidroxiapatita.
- 3.- Se utilizaron dos sales de calcio diferentes, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y CaCl_2 y se pudo comprobar que con ambas es posible obtener la hidroxiapatita.
- 4.- La caracterización fue fundamental para determinar que se había llegado a sintetizar nanopartículas de hidroxiapatita, siendo determinante, los estudios realizados por espectroscopia Raman.
- 5.- Se pudieron fabricar las pastillas Silicio Poroso con un tamaño de poro favorable para que la hidroxiapatita penetrara en los poros.
- 6.- Se implantó un método para lograr que la hidroxiapatita penetrara en los poros de las pastillas de Silicio Poroso.

7.- Se pudieron construir dos tipos diferentes de compósitos, el primero con hidroxiapatita y Silicio Poroso, y el segundo con un péptido e hidroxiapatita.

8.- Se pudo participar en un experimento para la regeneración de hueso en ratas, demostrándose hasta ahora que la hidroxiapatita sintetizada por nuestro método favorece la formación de colágeno que es el primer paso para la generación de hueso.

9.- De las dos primeras etapas se publicaron dos artículos arbitrados en revistas indexadas y de circulación internacional. De la tercera etapa se está preparando ya un artículo que esperamos sea publicado próximamente.

10.- resultados de las dos primeras etapas fueron presentados en congresos nacionales e internacionales.

Futuros trabajos

Existe un camino abierto en la investigación en cuanto a diversas aplicaciones de la HA por el simple hecho de que esta se obtenga en condiciones ambientales en el laboratorio. Una vez concluida esta tesis, no solamente se generan nuevos conocimientos sino que también se generan nuevas posibles líneas de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Hirvonen J, Laaksonen T, Peltonen L, Santos H, Lehto VP, Heikkilä T, Riikonen J, Mäkilä E, Salonen J, Feasibility of Silicon-Based Mesoporous Materials for oral Drug Delivery Applications, *Dosis*, 2008; 24 no 2: 129-149.
- [2] Eric M. Rivera-Muñoz, Hydroxyapatite-Based Materials: Synthesis and Characterization, *Biomedical Engineering – Frontiers and Challenges*, www.intechopen.com.
- [3] Sadat M, Khorasani MT, Dinpanah E, Jamshidi A, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Actabiomaterialia* 2013; 9:7591-7621.
- [4] Khan AF, Saleem M, Afzal A, Ali A, Khan A, Khan AR, Bioactive behavior of silicon substituted calcium phosphate based bioceramics for bone regeneration. *Materials Science and Engineering C* 2014; 35:245-252.
- [5] Cohen Jr. M.M, The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates, *Am. J. Med. Genet.* 2006; A 140 A: 2646–2706.
- [6] Koutsopoulos S, Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods, *J. Biomed. Mater. Res* 2002: 600-612.
- [7] Zakaria S.M, SharifZein S.H, Othman M. R, Yang F, Jansen J, Nanophase hydroxyapatite as a biomaterial in advanced hard tissue engineering: a review, *Tissue Eng. B Rev* 2013, <http://dx.doi.org/10.1089/ten.ten.2012.0>.
- [8] M. Zilberman, *Active Implants and Scaffolds for Tissue Regeneration*, Springer, Heidelberg, 2011.
- [9] Arcos D, RegíVallet, Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration, *ActaBiomater* 2010; 6: 2874-2888.
- [10] Zhang Z, Editor, *Hydroxyapatite Coatings for Biomedical Applications*, *Advances in Materials Science and Engineering*, CRC Press; 2013: 55-65.
- [11] Wei G, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2004;25(19):4749-57.
- [12] Kalita SJ, Bhardwaj A, Bhatt HA. Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 2007;27(3):441-9.
- [13]. Mostafa NY, Brown PW. Computer simulation of stoichiometric hydroxyapatite: Structure and substitutions. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. 2007;68(3):431-7.

- [14] Teixeira S, Rodriguez MA, Pena P, De Aza AH, De Aza S, Ferraz MP, et al. Physical characterization of hydroxyapatite porous scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 2009;29(5):1510-4.
- [15] Guo L, Huang M, Zhang X. Effects of sintering temperature on structure of hydroxyapatite studied with Rietveld method. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2003;14(9):817-22.
- [16] Kantharia N, Naik S, Apte S, Kheur M, Kheur S, Kale B. Nano-hydroxyapatite and its contemporary applications. *J Dent Res Sci Develop*. 2014;1(1):15.
- [17] Rodríguez Clemente R, LópezMacipe A, Gómez Morales J, Torrent Burgués J and Castaño V.M. Hydroxyapatite Precipitation: A Case of Nucleation-Aggregation-Agglomeration-Growth Mechanism. *Journal of the European Society*. 1998; 18: 1351-1356.
- [18] Zwebbe, C. Composite Materials. In *Mechanical Engineers Handbook*, M. Kutz (Ed.) doi:[10.1002/9781118985960.meh110](https://doi.org/10.1002/9781118985960.meh110)
- [19] Costescu A., Pasuk I., Ungureanu F., Physico-chemical properties of nano-size hexagonal hydroxyapatite powder synthesized by sol-gel. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2010; 5, no 4: 989-1000.
- [20] Ciobanu C.S, Andronescu E., Stoicu A., Influence of annealing treatment of nano-hydroxyapatite bioceramics on the vibrational properties. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2011; 6, no 2: 609-624.
- [21] Santos D.S Ricardo, V. dos. S. Rezende Marco, Atomistic Simulation of Intrinsic Defects and Trivalent and Tetravalent Ion Doping in Hydroxyapatite. *Hindawi Publishing Corporation*, 2014.
- [22] M. Motskin, D.M. Wright, K. Muller, N. Kyle, T.G. Gard, A.E. Porter, J.N. Skepper, *Biomaterials*, 2009; 30: 3307–3317.
- [23] Murakami Asuka, Arimoto Takafumi, Suzuki Dai, PhD Iwai-Yoshida Misato, Otsuka Fukunaga, Shibata Yo, Igarashi Takeshi, Kamijo Ryutaro, Miyazaki Takashi, *Nanomed-Nanotechnol* 8 (3) (2012) 374–382.
- [24] G. Binyamin, Bilal M. Shafi, Carlos M. Mery, *Biomaterials* 15 (2006) 276–283.
- [25] A. Costescu, I. Pasuk, F. Ungureanu, A. Dinischiotu, M. Costache, F. Huneau, S. Galaup, P. Le Coustumer, D. Predoi, *Dig. J. Nanomater. Bios*, 2010; 5: 989–1000.
- [26] F. Severiano, G. García, L. Castañeda, M. Salazar Villanueva, and J. Flores Méndez, "Importance of the Electrolyte in Obtaining Porous Silicon and How It Modifies the Optical

and Structural Properties: Optical and Microstructural Investigation," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2015, Article ID 942786, 6 pages, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/942786>.

[27] Munir G, Koller G, Di Silvio L, Edirisinghe M.J, Bonfield W, Huang J, The pathway to intelligent implants: osteoblast response to nano silicon-doped hydroxyapatite patterning, *J. R. Soc. Interface*, 2011; 8: 678-688.

[28] C.S. Ciobanu, E. Andronescu, B.S. Vasile, C.M Valsangiacom, R.V Ghita, D. Predoi, *Optoelectron, Adv. Mat.*, 2010; 4: 1515-1519.

[29] A.N Hayati, H.R. Rezaie, S.M. Hosseinalipour, Preparation of poly (3-hydroxybutyrate)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Mater. Lett.* 2011; 65: 736-739.

[30] S.M. Mousa, N.S. Ammar, H.A. Ibrahim, Removal of leads ions using hydroxyapatite nano-material prepared from phoshogypsum waste, *Journal of Saudi Chemical Society*. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.jscs.2014.12.006>.

[31] Juhong Yu a, Xiaobing Chub, YurongCai a, Peijian Tong b, Juming Yao, Preparation and characterization of antimicrobial nano-hydroxyapatite composites, *Materials Science and Engineering C*, 2014; 37: 54–59.

[32] Martín R. J, Manso M, Torres V, Biomedical applications of nanostructured porous silicon: a review, *Journal of Nanophotonics*, Vol. 4, 2010.

[33] Hwang S.W, Park G, Cheng H, Song JK, Kang SK, Yin L, Kim JH, Omenetto FG, Yonggang H, Lee KM, Rogers JA, 25th Anniversary Article: Materials for High-Performance Biodegradable Semiconductor Devices, *Adv. Mater*, 2014, 1992-2000.

[34] Martín R, Hernández J, Torres V, Manso M, Muños A, Nanostructured porous silicon-mediated drug delivery, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2014; 11: 917-930.

[35] Canham L, Bioactive silicon structure fabrication through nanoetching techniques, *Adv. Mater*, 2015; 7: 1033-1037.

[36] Pramatarova L, Pecheva E, Malinovska D, Pramatarova R, Bismayer U, Petrov T, Minkovski N, Porous Silicon as a substrate for hydroxyapatite growth, *Vacuum*, 2004; 7: 135-138.

[37] Porter A, Buckland T, Hing K, Best SM, Bonfield W, The Structure of the Bond between Bone and Porous Silicon- substituted Hydroxyapatite Bioceramic Implants, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006; 25-33.

- [38] Munir G, Koller G, Di Silvio L, Edirisinghe M.J, Bonfield W, Huang J, The pathway to intelligent implants: osteoblast response to nano silicon-doped hydroxyapatite patterning, *J. R. Soc. Interface*, 2011; 8: 678-688.
- [39] E.M. Carlisle, The nutritional essentiality of silicon, *Nutr. Rev.*1982; 40: 193–198.
- [40] K. Schwarz, D.B. Milne, Growth-promoting effects of silicon in rats, *Nature*, 1972; 239: 333–334
- [41] K.Schwarz, B. Ricci, S. Punsar, M. Karvonen, Inverse relation of silicon in drinking water and atherosclerosis in Finland, *Lancet*, 1977; 309: 538–539.
- [42] Vallet M, Arcos D, Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants, *J. Mater. Chem.*, 2005; 15: 1509-1516.
- [43] Pietak A, Reid J, Scott M.j, Sayer M, Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics, *Biomaterials*, 2007; 28: 4023-4032.
- [44] Patel N, Best S.M, Bonfield, A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules, *J. Mater. Sc: Materials in medicine*, 2002; 13: 1199-1206.
- [45] M. Vallet-Regí, D. Arcos, Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 1509–1516.
- [46] Nagaprasad P, Pravas K, Amita P, Room temperature synthesis of highly hemocompatible hydroxyapatite, study of their physical properties and spectroscopic correlation of particle size, *Nanoscale* 2010; 2: 2631-2638.
- [47] Santana V.M, J.O. Estevez, F.Ascencio, R. Mendoza, L. Bazan, C. Zorrilla and R. Herrera, Tannic acid assisted synthesis of flake like hydroxyapatite nanostructures at room temperature, *Appl. Phys. A* (2016) 122:868
- [48] Hoz L1, Romo E, Zeichner-David M, Sanz M, Nuñez J, Gaitán L, Mercado G, Arzate H. Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell Biol Int.* 2012 Feb;36(2):129-36. doi: 10.1042/CBI20110168.
- [49] Pramatarova Liliana, Pecheva Emilia, Dimova-Malinovska D, Presker Radina, Stutzmann Martin, Schwarz U, Kniep R: A novel laser-liquid-solid interaction process for hydroxyapatite formation on porous silicon. *Proc. of SPIE Vol.* 5830, Bellingham, WA, 2005.
- [50] Shaoqiang C, Zhu Z, Zhu J, Jian Z, Yanling S, Yu K, Wang W, Wang X, Xiao F, Luo L, Li S (2004) Hydroxyapatite coating on porous silicon substrate obtained by precipitation process. *Appl Surf Sci* 230:418–424

[51] P. E. Timchenko, E. V. Timchenko, E. V. Pisareva, Show all 7 authors, A. R. Kalimullina. Experimental studies of hydroxyapatite by Raman spectroscopy, *Journal of Optical Technology c/c of Opticheskii Zhurnal* 85(3):130 (2018)

[52] Wolfgang Pompe, Hartmut Worch, Wouter J. E. M. Habraken, Paul Simon, Rüdiger Kniep, Hermann Ehrlich and Peter Paufler. Octacalcium phosphate – a metastable mineral phase controls the evolution of scaffold forming proteins, *J. Mater. Chem. B*, 2015, 3, 5318-5329 (2015)

[53] Arellano Jiménez M.J, García García R, Reyes Gasga J. Synthesis and hydrolysis of octacalcium phosphate and its characterization by electron microscopy and X-ray diffraction. *Journal of physics and Chemistry of solids*; 70, 390-395 (2009).

[54] Nelson D.G, Williamson B.E, Low-temperature laser Raman spectroscopy of synthetic carbonated apatites and dental enamel. *Aust. J. Chem* 1982; 35: 715-727.

[55] Silva C.C, Pinheiro A. G, Miranda M. A. R, Góes J. C, Sombra A. S. B, Structural properties of hydroxyapatite obtained by mechanosynthesis. *Solid State Sci.* 2003; 5: 553-558.

[56] Cusco R, Guitian F, De Aza S, Artus L, Differentiation between hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate by means of μ -Raman spectroscopy. *J. Eur. Ceram. Soc.* 1998; 18:1301-1305.

[57] Li H, Ng BS, Khor KA, Cheang P, Clyne TW, Raman spectroscopy determination of phases within thermal sprayed hydroxyapatite splats and subsequent in vitro dissolution examination, *Act. Materialia* 2004; 52: 445-453.

[58] Vehkamäki Hanna, *Classical Nucleation Theory in Multicomponent Systems*, Springer, 133-138 2006.

[59] Jill Dill Pasterisa, Brigitte Wopenka, John J. Freeman, Keith Rogers, Eugenia Valsami-Jones, Jacqueline A.M. van der Houwen, Matthew J. Silva. Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials. *Biomaterials* 25 (2004) 229–238.

[60] Maricela Santana Vázquez, O Estevez, F Ascencio-Aguirre, R Mendoza-Cruz, L Bazán-Díaz, C Zorrilla, R Herrera-Becerra. Tannic acid assisted synthesis of flake-like hydroxyapatite nanostructures at room temperature, *Applied Physics A*, 2016.

[61] M Santana, JO Estevez, V Agarwal, R Herrera-Becerra. Room Temperature Crystallization of Hydroxyapatite in Porous Silicon Structures, *Nanoscale research letters*, 2016.