



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

**SÍNTESIS POR PRECIPITACIÓN QUÍMICA HÚMEDA DE NANO-
HIDROXIAPATITA AÑADIDO CON MAGNESIO**

TESIS:

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERIA DE
MATERIALES**

PRESENTA:

BRANDON ALEXIS CORREA PIÑA

TUTOR PRINCIPALE:

DR. MARIO ENRIQUE RODRÍGUEZ GARCÍA
Centro de física aplicada y tecnología avanzada

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ERIC MAURICIO RIVERA MUÑOZ
Centro de física aplicada y tecnología avanzada

DR. JOSÉ DE JESÚS PÉREZ BUENO
Centro de investigación y desarrollo tecnológico en electroquímica

SANTIAGO DE QUERETARO, QUERETARO A 26 DE NOVIEMBRE DEL 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a mi familia y a todas las personas que con su colaboración apoyaron a la realización de este trabajo de tesis para obtener el grado de maestro en ciencias.

Agradezco a mi asesor principal Dr. Mario Enrique Rodríguez García. Al Dr. Eric Mauricio Rivera Muñoz y al Dr. José de Jesús Pérez Bueno por formar parte de mi comité tutor, al Centro De Física Aplicada Y Tecnología Avanzada de la UNAM por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de trabajo y al proyecto PAPIIT por el apoyo brindado que ha sido un factor muy importante en la realización de este trabajo de obtención de grado. A CONACYT por el soporte financiero para llevar a cabo mis estudios de maestría. Y a el PAEP por el apoyo en la compra de reactivos y material de laboratorio.

También agradezco el apoyo brindado por la Dra. Sandra Milena Londoño Restrepo, que sin su apoyo, colaboración y comprensión este trabajo de tesis profesional no se habría podido completar.

Por último, agradezco al Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales (LaNCaM) del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM, al M. en C. Manuel Aguilar Franco, la Dra. Marcela Beatriz Millán Malo, Dra. Carmen Leticia Peza Ledesma y a la Dra. María Antonieta Mondragón Sosa que sin su ayuda en el análisis de las muestras realizadas para este trabajo no se habrían podido tener los resultados tan importantes que se presentan en este trabajo.

Tabla de Contenido

CAPITULO 1.....	1
Introduccion.....	1
Justificación.....	3
Hipótesis.....	3
Objetivo General.....	4
Objetivos específicos.....	4
Referencias.....	5
CAPITULO 2 HIDROXIAPATITA.....	7
2.1 ¿Qué es la hidroxiapatita?.....	7
2.2. Composición.....	8
2.3. Estructura de la hidroxiapatita.....	8
2.4. La hidroxiapatita en el cuerpo humano.....	9
Referencias.....	11
CAPITULO 3 METODOLOGIA.....	13
CAPITULO 4 ESPECTROSCOPIA INFRAROJA (IR).....	16
4.1 Análisis de grupos funcionales: Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	18
4.2 Resultados FTIR.....	19
Referencias.....	21
CAPITULO 5 ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN ÓPTICA CON PLASMA DE ACOPLAMIENTO POR INDUCCIÓN (ICP-OES).....	22
5.1 Análisis de la composición mineral: Espectrometría de plasma acoplado inductivamente con espectrómetro de emisión óptica (ICP-OES).....	24
5.2 Efecto de la adición de Mg en la relación Ca / P.....	25
Referencias.....	27

CAPÍTULO 6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)	28
6.1 Análisis morfológico: Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	29
6.2 Efecto de la adición y calcinación de Mg sobre la morfología.....	30
Referencias.....	31
CAPITULO 7 DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)	32
7.1 Análisis estructural de las fases: difracción de rayos X (XRD).....	35
7.2 Determinación de la fase cristalina.....	36
7.3 Calidad cristalina y tamaño de cristal de hidroxiapatitas añadidas con Mg.....	38
Referencias.....	39
CAPITULO 8 CALORIMETRÍA DE ESCANEEO DIFERENCIAL (DSC)	40
8.1 Análisis térmico: calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	41
8.2 Eventos térmicos durante la calcinación de hidroxiapatita con Mg agregado.....	41
Referencias.....	43
CAPITULO 9 ESPECTROSCOPIA RAMAN	44
9.1 Espectroscopia Raman.....	46
9.2 Análisis de calidad cristalina por espectroscopia Raman.....	46
Referencias.....	49
CAPITULO 10 CONCLUSIONES	50
ANEXOS	
PDF HIDROXIAPATITA.....	52
PDF NITRATO DE AMONIO.....	54
Primer artículo publicado: Synthesis and characterization of bioinspired nano-hydroxyapatite by wet chemical precipitation.....	56
Segundo artículo publicado: Synthesis and characterization of bioinspired nano-hydroxyapatite by wet chemical precipitation.....	64

Indicé de Figuras

Figura 1: Estructura cristalina de la hidroxiapatita	9
Figura 3: Relación Ca / P [4]	10
Figura 2: Contenido de Ca y P para HAp de Sigma, muestras crudas y sinterizadas. [4]	10
Figura 4: Composición mineral [4].....	11
Figura 5: a) Diagrama de Bloques del proceso de síntesis y b) Rampa de calentamiento del proceso de sinterización	15
Figura 6: Equipo interferómetro de espectrometría FTIR utilizando el principio de Michelson. [1]	18
Figura 7: Perkin Elmer Spectrum Two	19
Figura 8: Espectros IR de las muestras sintetizadas a) sin calcinar, b) calcinadas.	20
Figura 9: Principales componentes y el diseño de un equipo ICP-OES [1].	23
Figura 10: a) Microondas Mars Xpress de la marca CEM. b) Equipo ICP-OES Thermo iCAP 6500 Duo View	24
Figura 11; (a) Porcentaje de Ca y P, (b) Contenido de Mg, (c) Relación Ca / P y (d) Relación Mg / P de S-HAp Mg-HAp-1, Mg-HAp-2, Mg-HAp- 3. En todos los casos, los valores de HAp humana (H-HAp *), bovina (B-HAp *) y porcina (P-HAp *) reportados por Londoño- Restrepo et al. [4] están incluidos.....	26
Figura 12: Esquema de microscopio electrónico de barrido con detector de rayos X para análisis de (EDS). [1].....	29
Figura 13: Microscopio electrónico de barrido de alta resolución Hitachi SUB230.....	30

Figura 14: Imágenes SEM de (a) S-HAp; (b) C-HAp; (c) Mg-HAp-1; (d) C-Mg-HAp-1; (e) Mg-HAp-2; (f) C-Mg-HAp-2; (g) Mg-HAp-3; (h) C – Mg-HAp-3.	31
Figura 15: Tubo rayos X.....	33
Figura 16 Deducción de la ley de Bragg.....	34
Figura 17: Última IV de Rigaku	36
Figura 18: Patrones de difracción de rayos X de (a) sin calcinar; (b) muestras calcinadas.....	37
Figura 19: a) Cambios en el FWHM del avión (002); (b) Cambios en la posición máxima para el plano (002); (c) Cambios en el tamaño de los cristales para muestras con diferentes concentraciones de Mg.	38
Figura 20: Termogramas DSC para (a) S-HAp; (b) Mg-HAp-2; (c) Mg-HAp-3.....	42
Figura 21: Diagrama energético en el que las líneas horizontales representan estados vibracionales y se muestran transiciones entre estados energéticos para diferentes interacciones luz-materia.[1]	45
Figura 22: Espectroscopia Raman	46
Figura 23: Espectros Raman para (a) sin calcinar; (b) muestras sintéticas calcinadas; (c) FWHM del cambio Raman en 960 cm ⁻¹	46

Resumen

El magnesio es un ion presente en la hidroxiapatita biológica (HAp) de huesos de mamíferos que juega un papel vital en el proceso de osteogénesis, por ello en este trabajo se busca incluir este mineral en cantidades similares a las hidroxiapatitas biológicas mediante el método de precipitación química húmeda. Usando $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0, 0.032, 0.061 y 0.123 M) para incluir magnesio en la red. La inclusión de Mg en la red de HAp se confirmó mediante difracción de rayos X, que mostró un desplazamiento de los picos de difracción de las muestras con Mg en comparación con el HAp puro. La cuantificación de iones se realizó mediante espectroscopia de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP/EOS) para verificar que la inclusión de Mg este en niveles similares a las hidroxiapatitas naturales. Durante la síntesis se generan subproductos por lo cual es necesario calcinar las muestras a 600°C para asegurar la remoción de estos, este proceso origina un cambio fisicoquímico en las HAp como la coalescencia de cristales y recristalización. Raman confirma que el proceso de calcinación mejora la calidad de los cristales. Se utilizó microscopía electrónica de barrido para observar el tamaño de los cristales de las nanopartículas.

CAPÍTULO 1

Introducción

Actualmente, los biomateriales tienen una gran relevancia, dentro de estos materiales se encuentran los biocerámicos los cuales tienen una gran biocompatibilidad por lo cual han sido utilizados en la fabricación de implantes quirúrgicos [1], prótesis [2] y órganos artificiales [3]. La hidroxiapatita (HAp) es el principal componente mineral de los huesos con fórmula empírica $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, el cuerpo de los mamíferos utiliza este material como principal soporte, por esta razón es necesario imitar las propiedades fisicoquímicas de la hidroxiapatita ósea, en cuanto a composición, morfología, tamaño de cristal y cristalinidad [4]. Estudios recientes han informado que las propiedades fisicoquímicas de la HAp dependen directamente del método de obtención [5, 6], de igual forma tanto la hidroxiapatita biológica (Bio-HAp) como sintética son utilizadas para recubrimiento de prótesis metálicas debido a su biocompatibilidad. La HAp sintética se ha estudiado en los últimos años, con el fin de imitar los parámetros ya antes mencionados, la composición química juega un papel importante según Bose y col. [7], Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Cu^+ , Co^+ , B^{3+} , Mn^{2+} / $^{3+}$ y Si^{4+} desempeñan funciones vitales en los procesos de angiogénesis y osteogénesis, que están directamente ligados con el proceso de remodelación ósea. En la angiogénesis, el magnesio induce la producción de óxido nítrico en las células endoteliales que son conducidas a migrar y crecer, acelerando la formación de nuevos vasos sanguíneos [8]. Además, la deficiencia de magnesio también se ha relacionado con la osteoporosis, y se ha

reportado en trabajos anteriores que el HAp dopado con Mg exhibe propiedades osteogénicas mejores que la HAp pura [8, 9]. Las dietas deficientes de Mg producen una disminución de la densidad mineral ósea por otro lado, los altos contenidos de este mineral se han correlacionado con una mayor densidad mineral ósea, lo cual fue comprobado en un estudio realizado en ratas [10].

El magnesio (Mg) es el segundo ion sustitutivo más abundante en el hueso y el cuarto en el cuerpo [11]. Aproximadamente el 65% de este mineral se encuentra en huesos y dientes. La concentración de Mg se ha determinado para huesos humanos, bovinos y porcinos mediante diferentes técnicas cuantitativas como espectroscopia de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP/EOS) las cuales reportan que para huesos humanos adultos oscila entre 3000 y 6000 ppm[4], mientras que otros informes por fluorescencia de rayos X muestran valores más altos de hasta 14000 ppm, aunque cabe resaltar que este es un método semicuantitativo [12]. Estos valores indican que el rango de inclusión debe variar de 1000 a 12000 ppm.

Nagyné-Kovács y col. [13] prepararon muestras de HAp dopadas con Mg mediante precipitación química a 2 y 4% concentración molar de Mg / (Ca + Mg). Estos se calcinaron hasta 900 °C durante 2 h para mejorar la cristalinidad de las muestras. Los resultados mostraron que la inclusión de Mg redujo los parámetros de la red y disminuyó el tamaño del cristal a medida que aumentaba el contenido de Mg. Sin embargo, Londoño-Restrepo y col. [14], demostró que la calcinación de hueso humano a 900 °C produce un aumento en el tamaño del cristal de nanométrico hasta micrométrico, así como una transformación morfológica. Por tanto, el efecto de inclusión de Mg no puede evaluarse objetivamente debido al efecto simultáneo con el proceso de calcinación.

El objetivo de este trabajo fue sintetizar nano HAp y Mg-HAp utilizando el método químico húmedo para estudiar los cambios en las propiedades morfológicas, estructurales, térmicas y vibracionales debido a la inclusión de Mg que van desde 4000 a 12000 ppm, así como las diferencias en estas propiedades como resultado de un proceso de recocido a 600 ° C.

JUSTIFICACIÓN

Como ya se mencionó, la hidroxiapatita se puede obtener a partir de diversos métodos de síntesis y puede ser utilizada para distintas aplicaciones como catálisis, sensores, acarreo de fármacos e incluso aplicaciones médicas. Generalmente, los métodos de síntesis son enfocados a obtener HAp pura, pero es bien sabido que las HAp biológicas contienen distintos iones, entre ellos el Mg. En este trabajo de tesis se desarrolló una metodología y una metrología para estudiar el proceso de incorporación de iones de Mg en la HAp y su efecto en las propiedades morfológicas, estructurales, composicionales y ópticas que permitan su aplicación en diferentes áreas.

HIPOTESIS

Es posible la incorporación de iones de magnesio en la estructura de hidroxiapatita por el método de precipitación química húmeda a partir de fosfatos de amonio y nitratos de calcio.

OBJETIVO GENERAL

Sintetizar nano hidroxapatita mediante precipitación química y estudiar el efecto de la inclusión de magnesio en sus propiedades composicionales, morfológicas, estructurales y ópticas.

Objetivos específicos:

1. Obtener nano hidroxapatita mediante precipitación química a partir de fosfato de amonio y nitrato de calcio.
2. Incluir diferentes concentraciones iones de magnesio en la HAp sintética, por el método de precipitación química.
3. Determinar mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) las transiciones térmicas presentes en las muestras obtenidas para identificar posibles subproductos.
4. Estudiar los cambios en los estados vibracionales de la HAp sintética como resultado de la inclusión de Mg, mediante espectroscopia infrarroja (IR), para determinar la presencia de subproductos.
5. Cuantificar el contenido de Mg presente en la nano hidroxapatita, mediante la técnica de espectroscopia de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP/EOS), para verificar que la inclusión de Mg si es similar a la HAp del cuerpo humano.

6. Estudiar los cambios estructurales en la nano hidroxiapatita obtenida por precipitación química y las nano HAp con Mg, mediante difracción de rayos X (DRX) y determinar los cambios en la calidad cristalina que produce la inclusión de Mg.
7. Estudiar el efecto de la inclusión de Mg en la morfología de la nano HAp mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución (HR-SEM).
8. Estudiar mediante espectroscopia Raman los cambios en la calidad cristalina de la HAp por efecto de la inclusión de Mg.

Referencias

- [1]. Omar, O., Engstrand, T., Kihlström, L., Linder, B., Åberg, J., Shah, F. A., Palmquist, A., Birgersson, U., Elgali, I., Pujari-Palmer, M., Engqvist, H., & Thomsen, P. (n.d.). *In situ bone regeneration of large cranial defects using synthetic ceramic implants with a tailored composition and design*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007635117/-/DCSupplemental>
- [2]. Zarone, F., di Mauro, M. I., Spagnuolo, G., Gherlone, E., & Sorrentino, R. (2020). Fourteen-year evaluation of posterior zirconia-based three-unit fixed dental prostheses: A Prospective clinical study of all ceramic prosthesis. *Journal of Dentistry*, 101. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103419>
- [3]. Biggemann, J., Pezoldt, M., Stumpf, M., Greil, P., & Fey, T. (2018). Modular ceramic scaffolds for individual implants. *Acta Biomaterialia*, 80, 390–400. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.008>
- [4]. Londoño-Restrepo, S. M., Jeronimo-Cruz, R., Millán-Malo, B. M., Rivera-Muñoz, E. M., & Rodríguez-García, M. E. (2019). Effect of the Nano Crystal Size on the X-ray Diffraction Patterns of Biogenic Hydroxyapatite from Human, Bovine, and Porcine Bones. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42269-9>
- [5]. Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., Dinpanah-Khoshdargi, E., & Jamshidi, A. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 9, Issue 8, pp. 7591–7621). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>
- [6]. Bee, S. L., & Hamid, Z. A. A. (2020). Hydroxyapatite derived from food industry bio-wastes: Syntheses, properties and its potential multifunctional applications. In *Ceramics*

International (Vol. 46, Issue 11, pp. 17149–17175). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.04.103>

[7]. Bose, S., Fielding, G., Tarafder, S., Bandyopadhyay, A., & Keck, W. M. (n.d.). *Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics*. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.06>

[8]. Maier, J. A. M., Bernardini, D., Rayssiguier, Y., & Mazur, A. (2004). High concentrations of magnesium modulate vascular endothelial cell behaviour in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1689(1), 6–12.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.02.004>

[9]. Kamalanathan, P., Ramesh, S., Bang, L. T., Niakan, A., Tan, C. Y., Purbolaksono, J., Chandran, H., & Teng, W. D. (2014). Synthesis and sintering of hydroxyapatite derived from eggshells as a calcium precursor. *Ceramics International*, 40(PB), 16349–16359.
<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.07.074>

[10]. Wolf, F. I., & Cittadini, A. (n.d.). *Chemistry and biochemistry of magnesium*.
www.elsevier.com/locate/mam

[11]. Jang, H. L., Jin, K., Lee, J., Kim, Y., Nahm, S. H., Hong, K. S., & Nam, K. T. (2014). Revisiting whitlockite, the second most abundant biomineral in bone: Nanocrystal synthesis in physiologically relevant conditions and biocompatibility evaluation. *ACS Nano*, 8(1), 634–641. <https://doi.org/10.1021/nn405246h>

[12]. Farzadi, A., Bakhshi, F., Solati-Hashjin, M., Asadi-Eydivand, M., & Osman, N. A. A. (2014). Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization. *Ceramics International*, 40(4), 6021–6029.
<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.11.051>

[13]. Nagyné-Kovács, T., Studnicka, L., Kincses, A., Spengler, G., Molnár, M., Tolner, M., Lukács, I. E., Szilágyi, I. M., & Pokol, G. (2018). Synthesis and characterization of Sr and Mg-doped hydroxyapatite by a simple precipitation method. *Ceramics International*, 44(18), 22976–22982. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.09.096>

[14]. Londoño-Restrepo, S. M., Millán-Malo, B. M., del Real-López, A., & Rodríguez-García, M. E. (2019). In situ study of hydroxyapatite from cattle during a controlled calcination process using HT-XRD. *Materials Science and Engineering C*, 105.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110020>

CAPÍTULO 2

HIDROXIAPATITA

2.1 ¿Qué es la hidroxiapatita?

La Hidroxiapatita (HAp) es un material perteneciente al grupo de los fosfatos cálcicos con fórmula $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{HO})_2$, este material ha sido ampliamente utilizada en aplicaciones biomédicas como tratamientos quirúrgicos, ortopédicos y odontológicos para reparar, aumentar o sustituir el tejido óseo dañado, ya que es un material biocompatible, bioactivo y posee propiedades osteoconductoras y osteoinductoras, es decir, estimula la formación del hueso [1, 2]. Se puede obtener a partir de síntesis química mediante métodos como: precipitación, hidrolisis, sol-gel, etc. [3, 4], o a partir de fuentes naturales como huesos de mamíferos un proceso mediante el cual los huesos son molidos y calcinados a altas temperaturas con el fin de eliminar la fase orgánica, de este modo se produce HAp no estequiométrica similar a la que se encuentra en la fase inorgánica de los huesos ya que presenta trazas de elementos como Mg, Na, Zn, F, Si y CO_3 , haciendo que la HAp sea más compatible con el hueso humano [5,6].

2.2. Composición

La HAp está compuesta principalmente por calcio y fósforo, aunque en el caso de la obtenida a partir de fuentes biológicas puede presentar trazas de elementos como sodio y magnesio. Una de las principales características de este biomaterial es la relación molar calcio-fósforo ya que entre menor sea la relación, mayor es la acidez y solubilidad de las muestras [7], además de ser un factor relacionado con las propiedades mecánicas del material. La HAp en fase pura tiene una relación molar Ca/P de 1.67, la cual presenta mayor rigidez comparada con una HAp deficiente en calcio con relación molar de 1.5 [8].

2.3. Estructura de la hidroxiapatita

La HAp posee una estructura hexagonal con parámetros de red: $a = b = 9.42 \text{ \AA}$, y $c = 6.88 \text{ \AA}$ y su grupo espacial es el P63/m, el cual indica la presencia de un eje de simetría de orden 6, ejes helicoidales ternarios y planos de reflexión como se puede ver en la Figura 1 [9]. La HAp se caracteriza por ser químicamente estable y composicionalmente similar a la fase mineral de los huesos que es conocida como bio hidroxiapatita o hidroxiapatita biológica (Bio-HAp). Ambos tipos de HAp se han utilizado como materiales de injerto óseo en ingeniería de tejidos duros. Las HAp están compuestas de iones encontrados comúnmente en medios fisiológicos, lo que los hace altamente biocompatibles; por esta razón se busca introducir iones secundarios en las HAp sintéticas [10]. Pequeñas cantidades de elementos como Mg^{+2} , Na^+ , Zn^{+2} , K^+ y CO_3^{-2} , entre otros,

suelen ser los iones que se intercambian en la estructura original, ya que de manera natural estas pequeñas trazas juegan un papel metabólico y de rendimiento general. Aunque la sustitución no afecta drásticamente las propiedades cristalográficas si inducen a modificaciones de los parámetros cristalográficos y la modificación del grado de cristalinidad, los cuales tienen influencia en la solubilidad de la HAp en condiciones fisiológicas, y esto trae consigo la modificación de las propiedades biológicas y mecánicas [11].

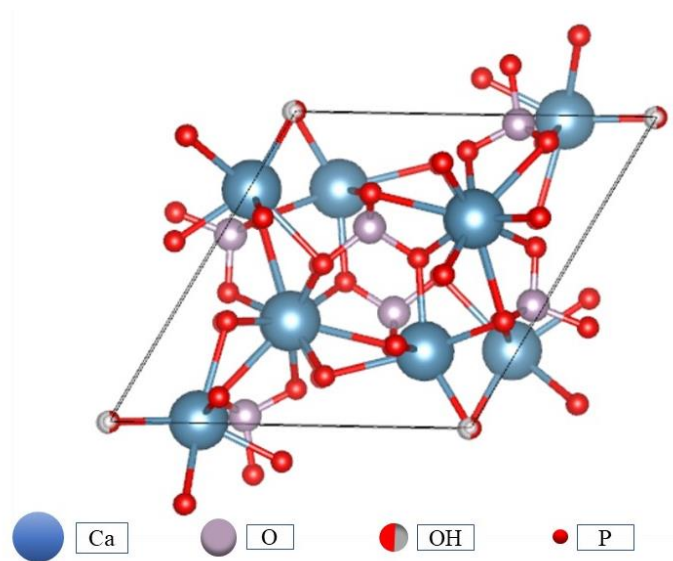


Figura 1: Estructura cristalina de la hidroxiapatita

2.4. La hidroxiapatita en el cuerpo humano

El principal constituyente inorgánico del tejido óseo en los vertebrados es la HAp en forma de cristales, originados por la biomineralización en condiciones ambientales de presión y temperatura, en los huesos, dientes y los tendones para dar a estos órganos dureza, estabilidad y funcionalidad. La Figura 2, 3 y 4 es un estudio realizado por Londoño Restrepo y col.[12] donde se estudiaron los contenidos minerales de huesos humanos, bovino y porcinos. En la Figura 2 donde se muestra

que los niveles de Ca en los huesos son más altos para los humanos que para los bovinos y porcinos; podría ser debido a la dieta rica en calcio del humano y a que la HAp está carbonatada. Después de la calcinación, la relación estequiométrica entre el Ca y el P no sufre ningún cambio porque las muestras se desgrasaron y desproteinizaron antes del proceso.

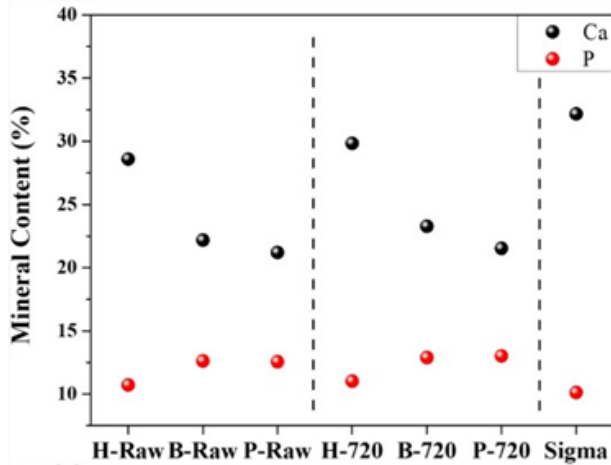


Figura 3: Contenido de Ca y P para HAp de Sigma, muestras crudas y sinterizadas. [4]

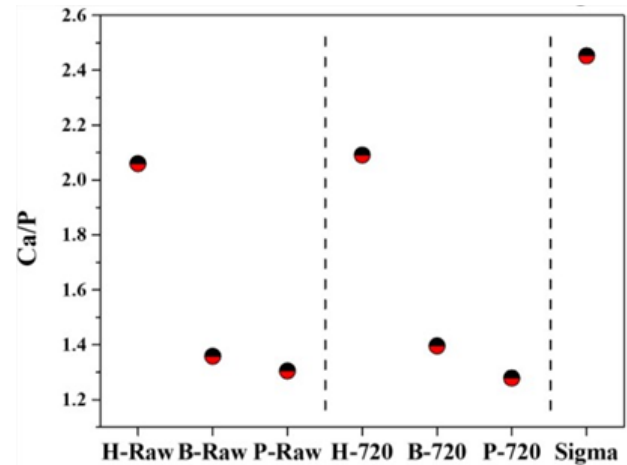


Figura 2: Relación Ca / P [4]

La Figura 3 muestra la relación estequiométrica de los elementos mayoritarios Ca y P para muestras de Bio-HAp sin calcinar y calcinadas. Después de la calcinación a 720°C, la relación estequiométrica entre el Ca y el P no sufre ningún cambio porque las muestras desgrasaron y desproteinizaron antes del proceso.

La Figura 4 muestra el contenido de las trazas minerales en los huesos que es bien conocido por mejorar la regeneración ósea. La presencia de estos elementos depende de varios factores como la dieta, la edad, el género, entre otros.

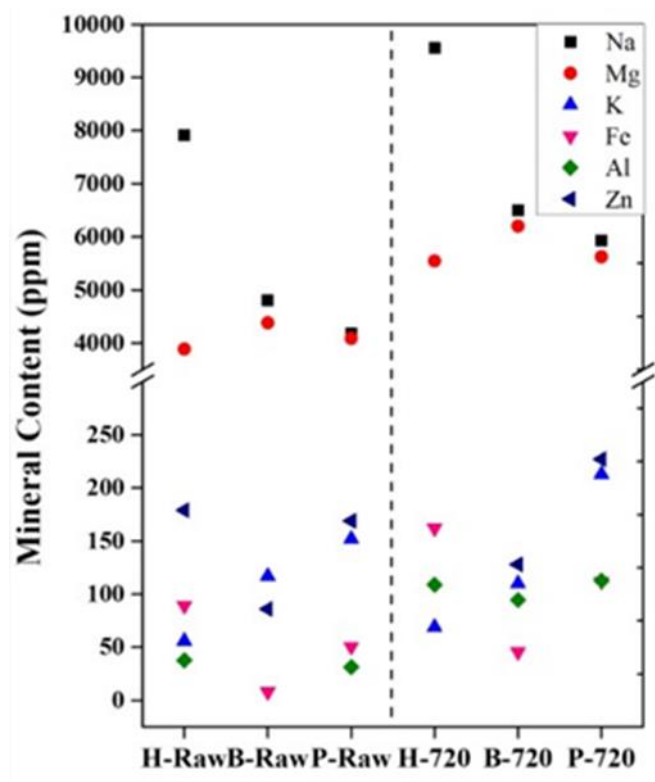


Figura 4: Composición mineral [4]

También es notable que la incineración no afecte el contenido mineral, y las pequeñas variaciones en estos valores corresponden a un efecto de concentración. Los elementos minoritarios pueden ubicarse como sustitutos o átomos intersticiales que pueden cambiar su estructura. [12]

Referencias

- [1]. Lett, J. A., Sundareswari, M., & Ravichandran, K. (2016). Porous hydroxyapatite scaffolds for orthopedic and dental applications-the role of binders. In *Recent Advances In Nano Science And Technology* (Vol. 3). www.materialstoday.com/proceedings
- [2]. Ansari, M., Morteza Naghib, S., Moztarzadeh, F., & Salati, A. (2011). synthesis and characterization of hydroxyapatite-calcium hydroxide for dental composites. In *Original papers Ceramics-Silikáty* (Vol. 55, Issue 2).
- [3]. Abidi, S. S. A., & Murtaza, Q. (2014). Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction. *Journal of Materials Science and Technology*, 30(4), 307–310. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2013.10.011>
- [4]. Agrawal, K., Singh, G., Puri, D., & Prakash, S. (2011). Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Powder by Sol-Gel Method for Biomedical Application. In *Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering* (Vol. 10, Issue 8).

- [5]. Fadli, A., Akbar, F., Putri, P., Pratiwi, D. I., & Muhara, I. (2014). *Hydroxyapatite Powder Prepared by Low Temperature Hydrothermal Method from Seashells*.
- [6]. Kamalanathan, P., Ramesh, S., Bang, L. T., Niakan, A., Tan, C. Y., Purbolaksono, J., Chandran, H., & Teng, W. D. (2014). Synthesis and sintering of hydroxyapatite derived from eggshells as a calcium precursor. *Ceramics International*, 40(PB), 16349–16359. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.07.074>
- [7]. Neves, J. G., Navarro da Rocha, D., Lopes, C. C., Prado da Silva, M. H., Sinhoreti, M. A. C., Correr-Sobrinho, L., Fraga, M. A. A., & Correr, A. B. (2021). Effect of pH level and calcination on the production of calcium phosphates by acidic route of wet precipitation. *Ceramica*, 67(382), 236–243. <https://doi.org/10.1590/0366-69132021673822965>
- [8]. Ramesh, S., Natasha, A. N., Tan, C. Y., Bang, L. T., Ramesh, S., Ching, C. Y., & Chandran, H. (2016). Direct conversion of eggshell to hydroxyapatite ceramic by a sintering method. *Ceramics International*, 42(6), 7824–7829. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.02.015>
- [9]. Farzadi, A., Bakhshi, F., Solati-Hashjin, M., Asadi-Eydivand, M., & Osman, N. A. A. (2014). Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization. *Ceramics International*, 40(4), 6021–6029. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.11.051>
- [10]. Kalita, S. J., Bhardwaj, A., & Bhatt, H. A. (2007). Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering. *Materials Science and Engineering C*, 27(3), 441–449. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.018>
- [11]. Correa-Piña, B. A., Gomez-Vazquez, O. M., Londoño-Restrepo, S. M., Zubieta-Otero, L. F., Millan-Malo, B. M., & Rodriguez-García, M. E. (2021). Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite added with magnesium obtained by wet chemical precipitation. *Progress in Natural Science: Materials International*, 31(4), 575–582. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2021.06.006>
- [12]. Londoño-Restrepo, S. M., Jeronimo-Cruz, R., Millán-Malo, B. M., Rivera-Muñoz, E. M., & Rodriguez-García, M. E. (2019). Effect of the Nano Crystal Size on the X-ray Diffraction Patterns of Biogenic Hydroxyapatite from Human, Bovine, and Porcine Bones. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42269-9>

Capítulo 3

MÉTODOLÓGIA

Para la síntesis de HAp se utilizó como precursor del ion fosfato (PO_4)³⁻ fosfato de amonio dibásico $[(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{PO}_4]$ (99.1%, J.T. Baker, México; con Código 0776-01), mientras que como promotores del ion Ca^{2+} se empleó una solución de nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (99%, Sigma Aldrich, Japón; con código 1002417639). En el caso del fosfato de amonio se preparó una solución 0.6 molar, mientras que para el nitrato de calcio la solución se aforo a 1 molar, con el fin de conservar la relación estequiométrica 1.67 respecto del calcio y el fósforo. Las soluciones fueron preparadas en agua destilada en agitación constante. Para la síntesis se necesita que se mantenga en agitación constante y a una temperatura de 37.5 °C, y el pH = 9 esto se controla con hidróxido de amonio (NH_4OH) (28.0–30.0%, J.T. Baker, USA; con código 9721-02) utilizando un medidor de pH OAKTON (serie 1100).

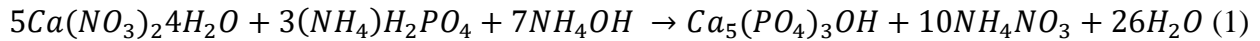
En el caso de la HAp con magnesio además de los precursores de fosfato y calcio se utilizó como precursor del ion Mg^{+2} , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (grado ACS, Golden bell, México; con código 26905) con el cual se prepararon soluciones a 0.032, 0.061, y 0.123 M respectivamente, con el fin de

obtener un rango de 4000 a 12000 ppm este rango fue escogido de acuerdo con trabajos ya reportados en la literatura.

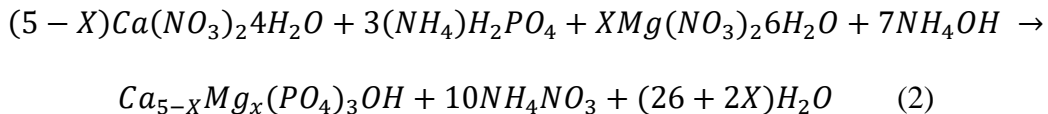
Para la síntesis de HAp con Mg se mezcló la solución de nitrato de calcio y la solución de nitrato de Mg a distintas concentraciones, de igual forma se agregó la solución con el nitrato de Ca y Mg gota a gota, los siguientes pasos de la metodología fueron los mismos que en la síntesis de la HAp pura.

Las muestras con Mg a distintas concentraciones fueron etiquetadas como S-HAp (sin Mg), Mg-HAp-1 (0.032 M Mg (NO₃)₂6H₂O), Mg-HAp-2 (0.061 M Mg (NO₃)₂6H₂O) y Mg-HAp-3 (0,123 M de Mg (NO₃)₂6H₂O), respectivamente. Y luego, las muestras se calcinaron a 600 °C, a una velocidad de calentamiento de 5 ° C / min durante 3 h para eliminar los subproductos de la reacción. Las muestras calcinadas se etiquetaron como C-S-HAp, C-Mg-HAp-1, C-Mg-HAp-2 y C MgHAp-3.

La reacción para la formación de HAp sintética es:



La reacción para la formación de Mg-HAp es:



Donde X representa el grado de sustitución de Mg en la red de HAp. En la Figura 10 a se presenta el diagrama de bloques del proceso para sintetizar HAp, y la historia térmica para la calcinación a 600 ° C se muestra en la Figura 10 b.

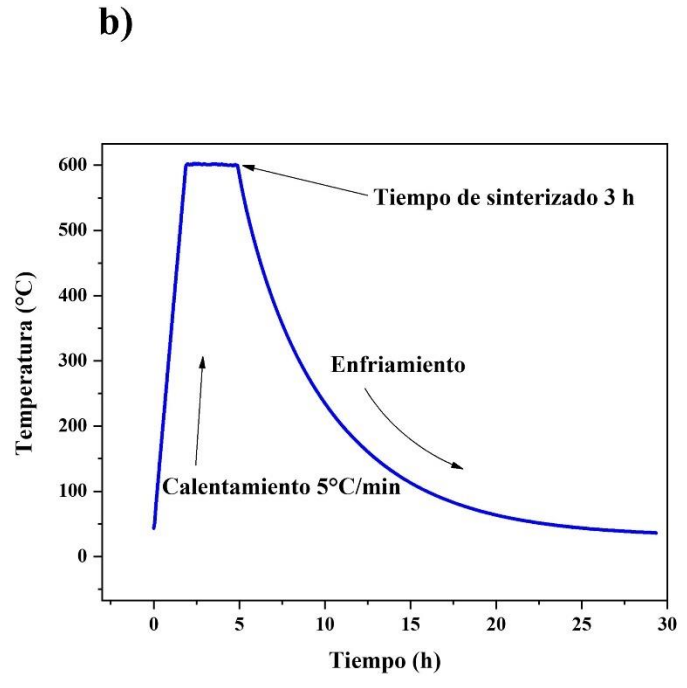
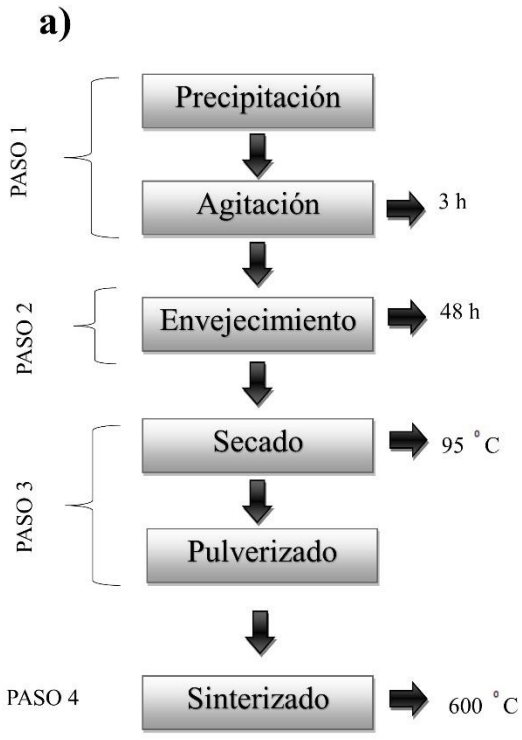


Figura 5: a) Diagrama de Bloques del proceso de síntesis y b) Rampa de calentamiento del proceso de sinterización

Capítulo 4

ESPECTROSCOPIA INFRAROJA (IR)

La espectroscopía de absorción infrarroja (IR) recibe su nombre debido a la región del espectro electromagnético implicado (12800 - 10 cm^{-1}), que se divide en tres zonas: IR cercano (NIR): 12800-4000 cm^{-1} , IR medio: 4000-400 cm^{-1} , e IR lejano: 400-10 cm^{-1} . Siendo en el IR medio donde se dan la mayoría las aplicaciones analíticas. El NIR requiere una mínima o nula preparación de la muestra y ofrece un análisis cuantitativo sin consumirla o destruirla. Por su parte el IR lejano requiere el uso de fuentes y materiales ópticos especiales. El IR es utilizado para el análisis de compuestos orgánicos, inorgánicos u organometálicos que contengan átomos pesados (masa atómica superior a 19) y proporciona información útil en estudios estructurales [1]. Una de las grandes ventajas de la espectroscopia IR es su versatilidad, ya que permite estudiar prácticamente cualquier muestra con independencia del estado en que se encuentre: líquidos, disoluciones, pastas, polvos, fibras, películas, gases o superficies son algunos ejemplos. Para que una molécula muestre absorción en el infrarrojo tiene que poseer una característica en específico: un momento dipolar eléctrico debe cambiar durante el movimiento, es decir, la interacción de la radiación infrarroja con la materia origina cambios en los dipolos moleculares asociados a vibraciones y rotaciones de

grupos funcionales presentes en el compuesto. Las vibraciones pueden ser vistas como un cambio en la longitud de la unión (estiramiento) o en el ángulo de unión (flexión), mientras que algunos enlaces pueden estirarse en fase (estiramiento simétrico) o fuera de fase (estiramiento asimétrico), entre otros modos vibracionales [1].

El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de esta molécula. Así, entre otras aplicaciones, el espectro IR se puede usar como “huella dactilar” en la identificación de muestras desconocidas mediante la comparación con espectros de referencia [1].

Los espectrómetros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) modernos emplean un interferómetro y explotan el proceso matemático bien establecido de la transformación de Fourier. El equipo de interferometría más usado es la espectrometría FTIR el cual utiliza el principio de Michelson (Figura 6), donde la radiación primero incide en un divisor o separador que divide el haz de la luz en dos partes iguales (espejo semirreflejante). Los dos haces de luz interfieren en el divisor posterior a su viaje de vuelta cuando son reflejados sobre otros dos espejos. Uno acomodado frente a la trayectoria del haz original (espejos móviles) y el otro perpendicular (espejo fijo).

La muestra es colocada en esta trayectoria y posteriormente se encuentra el detector IR, donde la intensidad resultante de la superposición de los dos haces es medida como función del desfase o desfases del espejo móvil en su desplazamiento respecto la posición intermedia [1].

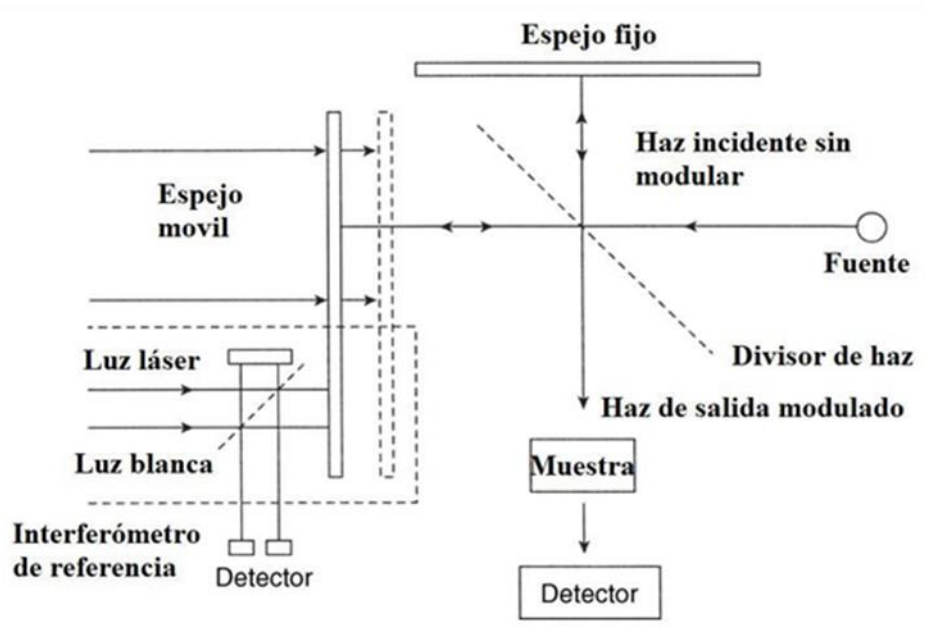


Figura 6: Equipo interferómetro de espectrometría FTIR utilizando el principio de Michelson. [1]

4.1 Análisis de grupos funcionales: Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier se utilizó para el estudio de los estados vibracionales de S-HAp, Mg-HAp-1, Mg-HAp-2 y Mg-HAp-3, y las muestras calcinadas: C-S-HAp, C-Mg-HAp-1, C-Mg-HAp-2 y C-Mg-HAp-3 con el fin de verificar la eliminación de los subproductos de la reacción, así como la identificación de los grupos funcionales. Las muestras fueron molidas en un mortero previamente para homogeneizar la muestra y obtener un polvo, se analizaron mediante reflexión total atenuado con 16 repeticiones. Las pruebas de espectros se llevaron a cabo en un Perkin Elmer Spectrum Two equipado con un accesorio ATR (reflectancia total atenuada) con un cristal de diamante en el rango espectral de 600 a 4000 cm^{-1} a una resolución espectral de 4 cm^{-1} , el cual se puede ver en la Figura 7.



Figura 7: Perkin Elmer Spectrum Two

4.2 Resultados FTIR

Se utilizó FTIR para caracterizar inicialmente las hidroxiapatitas sintéticas (Figura 8 a). Estos espectros verificaron la existencia de hidroxiapatita en todas las muestras no calcinadas, pero también se encontraron bandas de subproductos formados durante la reacción como nitrato (bandas B, C, D, G y K) y carbonato (F). Los grupos funcionales que generaron estos modos vibraciones se asignaron a cada banda, y sus ubicaciones se presentaron en la Tabla 1 referenciadas por la literatura. Por esta razón, se calcinaron S-HAp, Mg-HAp-1, MgHAp-2 y Mg-HAp-3 a 600 °C. Como se muestra en la Figura 8 b, donde las bandas que se pueden ver son solo de hidroxiapatita (A, H, I, J y L), por lo que podemos decir que esta temperatura fue suficiente para eliminar estos productos químicos adicionales.

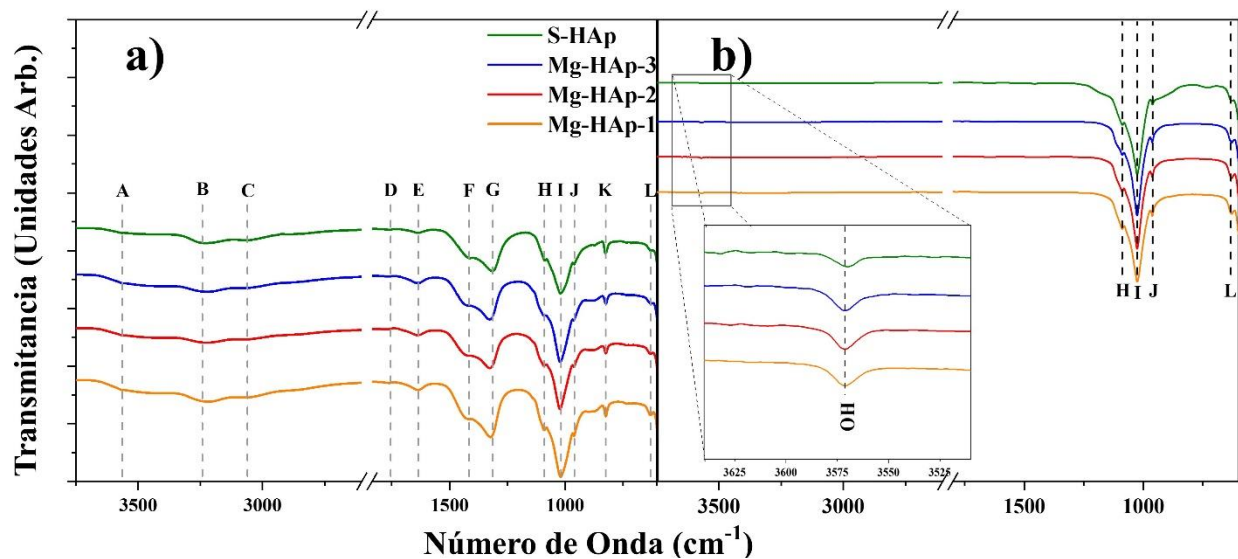


Figura 8: Espectros IR de las muestras sintetizadas a) sin calcinar, b) calcinadas.

Bandas FTIR			
Grupos funcionales	Numero de Onda (cm-1)*	Numero de Onda (cm-1)**	Referencias
vCOOH(HAp)	(A) 3564 ^{ab}	3570	[2]
vN-H	(B) 3251 ^a	3250	[3]
vN-H	(C) 3025 ^a	3020	[4]
v ₁ +v ₄ NO ₃ ⁻	(D) 1756 ^a	1756	[5]
δOH(H ₂ O)	(E) 1633 ^a	1637	[6]
v ₃ CO ₃ ²⁻	(F) 1417 ^a	1417, 1415	[2]
v ₂ NO ₃ ⁻	(G) 1321 ^a	1314	[6]
v ₃ PO ₄ ³⁻	(H) 1090 ^{ab}	1088, 1099	[2]
v ₃ PO ₄ ³⁻	(I) 1024 ^{ab}	1014	[2]
v ₁ PO ₄ ³⁻	(J) 960 ^{ab}	960, 978	[2]
v ₂ NO ₃ ⁻	(K) 827 ^a	831	[5]
vO-H(H ₂ O)	(L) 634 ^{ab}	632, 633	[2]

*Este Trabajo, **Posiciones Reportadas, a.- Muestras sin calcinar, b.- Muestras calcinadas
v.- stretching, δ.- bending.

Tabla 1: Posiciones de las bandas de infrarrojo observadas para muestras calcinadas y no calcinadas

Referencias

- [1]. Smith, Brian C. *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. CRC press, 2011.
- [2]. Londoño-Restrepo, S. M., Zubieta-Otero, L. F., Jeronimo-Cruz, R., Mondragon, M. A., & Rodriguez-García, M. E. (2019). Effect of the crystal size on the infrared and Raman spectra of bio hydroxyapatite of human, bovine, and porcine bones. *Journal of Raman Spectroscopy*, 50(8), 1120–1129. <https://doi.org/10.1002/jrs.5614>
- [3]. Yang, S. S., & Chen, Z. B. (2018). The Study on Aging and Degradation Mechanism of Ammonium Polyphosphate in Artificial Accelerated Aging. *Procedia Engineering*, 211, 906–910. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.12.091>
- [4]. Kubota, H., Liu, C., Toyao, T., Maeno, Z., Ogura, M., Nakazawa, N., Inagaki, S., Kubota, Y., & Shimizu, K. I. (2020). Formation and Reactions of NH₄NO₃ during Transient and Steady-State NH₃-SCR of NO_x over H-AFX Zeolites: Spectroscopic and Theoretical Studies. *ACS Catalysis*, 10(3), 2334–2344. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b05151>
- [5]. Hong Bo Wu, Man Nin Chan, Chak K, «FTIR Characterization of Polymorphic Transformation of Ammonium Nitrate,» *Aerosol Science and Technology*, vol. 41, n° 6, pp. 581-588, 2007.
- [6]. S. Martinez, «Characterization of alkali-metal and alkaline-earth nitrates by vibrational spectroscopy,» *Materiales de construcción*, vol. 42, p. 227, 1992.

Capítulo 5

ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN ÓPTICA CON PLASMA DE ACOPLAMIENTO POR INDUCCIÓN (ICP-OES)

La espectroscopia de emisión óptica con plasma de acoplamiento por inducción (ICP- OES) es una herramienta poderosa para la determinación de metales en diferentes matrices. Se pueden realizar mediciones de un solo elemento rentable con un monocromador simple/combinación de tubo fotomultiplicador (PMT) o simultáneamente hasta 70 elementos con la combinación de un policromado y un detector de matriz. El rendimiento analítico es muy bueno en comparación con otras técnicas de análisis inorgánicos, especialmente con elementos que estén en bajas proporciones[1].

La muestra generalmente se transporta al instrumento como una muestra líquida. Las muestras en forma de líquido o gas se pueden inyectar de forma directa en el equipo, mientras que las muestras sólidas normalmente se requieren extracción o digestión ácida empleando HNO_3 y HCl para que

los analitos (elemento, compuesto o ion) estén presentes en una solución líquida para posteriormente ser introducidos en el equipo. Donde el líquido se convierte en un aerosol a través de un proceso conocido como nebulización. La muestra de aerosol es transportada al plasma donde es excitada y/o ionizada. Los espectros son separados en sus diferentes longitudes de onda individuales para poder identificar la emisión de cada especie excitada y su intensidad mediante un sistema de monocromadores y policromadores. Para la detención real de la luz, después de haber separado las longitudes de onda de otras, se utiliza un detector fotosensible tal como un tubo fotomultiplicador (PMT) o técnicas de detención avanzadas tales como un dispositivo de inyección de carga (CID) o un dispositivo de carga. La radiación detectada se convierte en señales electrónicas que a su vez se convierte en información que es procesada por un sistema informático. La Figura 9 muestra un esquema general de las partes del equipo [1].

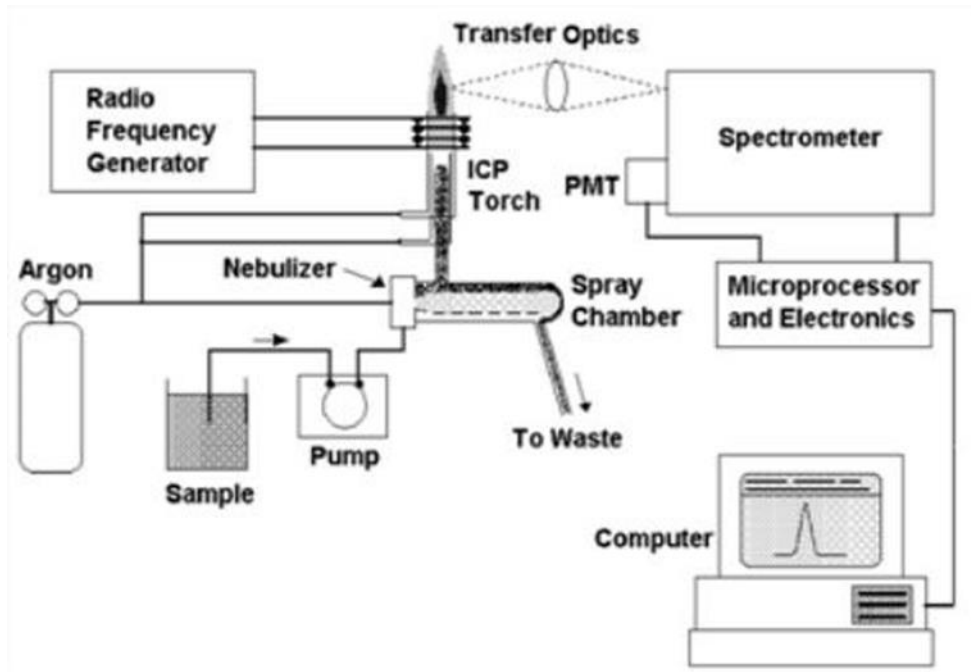


Figura 9: Principales componentes y el diseño de un equipo ICP-OES [1].

5.1 Análisis de la composición mineral: Espectrometría de plasma acoplado inductivamente con espectrómetro de emisión óptica (ICP-OES)

La composición mineral de las muestras sintéticas sin calcinar fue determinada por plasma acoplado inductivamente con espectrómetro de emisión óptica (ICP-OES) utilizando un equipo Thermo Fischer Scientific ICAP serie 6000 con un plasma de argón. La preparación de las muestras Mg-HAp para ser analizadas por el ICPOES consistió en una digestión ácida, en un sistema cerrado por microondas utilizando un Mars Xpress de la marca CEM Figura 10. Se digirieron 0,1 g de cada muestra con 7 ml de ácido nítrico (Baker 69,3%) sometiénolo a una rampa de calentamiento de temperatura ambiente a 190 °C durante 15 minutos; las muestras se analizaron por duplicado. Posteriormente se filtró utilizando membranas de filtración con un tamaño de poro de 0.45 μm , con el fin de evitar obstrucciones en el equipo, y se aforo a 100 ml con agua desionizada. Y finalmente, las muestras se expusieron al plasma de argón para excitar los elementos de las muestras e identificarlos a través de su emisión característica.

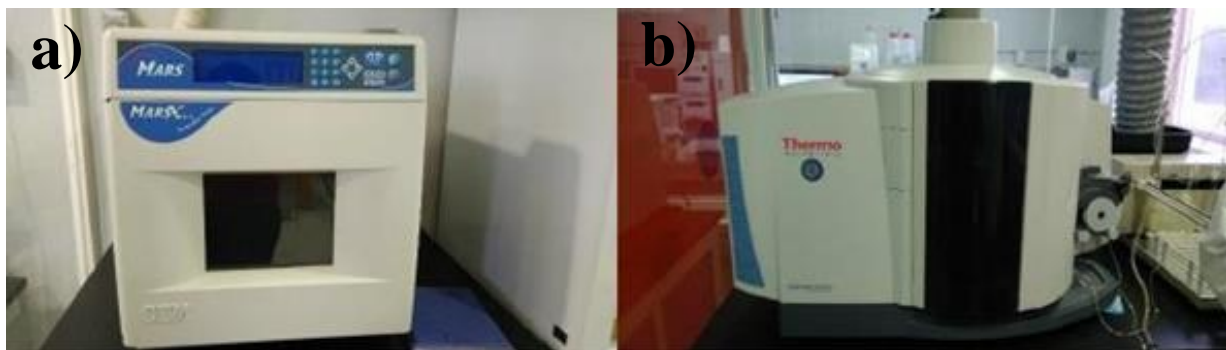


Figura 10: a) Microondas Mars Xpress de la marca CEM. b) Equipo ICP-OES Thermo iCAP 6500 Duo View

5.2 Efecto de la adición de Mg en la relación Ca / P

La Figura 11 a muestra los contenidos de Ca y P para las muestras sintéticas sin calcinar; S-HAp: 41.92 y 20.11%; Mg-HAp-1: 21.90 y 16.38%; Mg-HAp-2: 23.31 y 17.93%; y Mg-HAp-3: 23.45 y 17.29%, respectivamente. Las muestras de HAp que contenían Mg tenían porcentajes más bajos de Ca y P, lo que se debe a la inclusión de Mg en la red de HAp en los sitios de Ca y a la presencia de subproductos de reacciones químicas. La hidroxiapatita pura tiene un 38.89 por ciento de calcio y un 18.49 por ciento de fósforo en teoría. Las hidroxiapatitas humanas (H-HAp), bovinas (B-HAp) y porcinas (P-HAp), por otro lado, tienen valores más bajos que las hidroxiapatitas sintéticas puras [2].

Las hidroxiapatitas con Mg añadido tienen niveles de Ca y P que son similares a las hidroxiapatitas de mamíferos y valores teóricos. El contenido de Mg (ppm) para cada muestra sintética no calcinada se muestra en la Figura 11 b, donde se observó una tendencia lineal ascendente, como se predijo, dadas las concentraciones de Mg utilizadas. Las hidroxiapatitas con Mg añadido tienen niveles de Ca y P que son similares a las hidroxiapatitas de mamíferos y valores teóricos. El contenido de Mg (ppm) para cada muestra sintética no calcinada se muestra en la Figura 11 b, donde se observó una tendencia lineal ascendente, como se predijo, dadas las concentraciones de Mg utilizadas. Vale la pena mencionar que los niveles de Mg oscilan entre 3626 y 11205 ppm. En otras palabras, se usó Mg para sintetizar HAp dentro de los parámetros descritos para la hidroxiapatita de mamífero. La concentración de Mg de Mg-HAp-1 es la más similar a las muestras reportadas por Londoño-Restrepo y col. [2].

La relación Ca / P también se redujo cuando se añadió Mg como resultado de su inclusión, como se ve en la Figura 11 c.

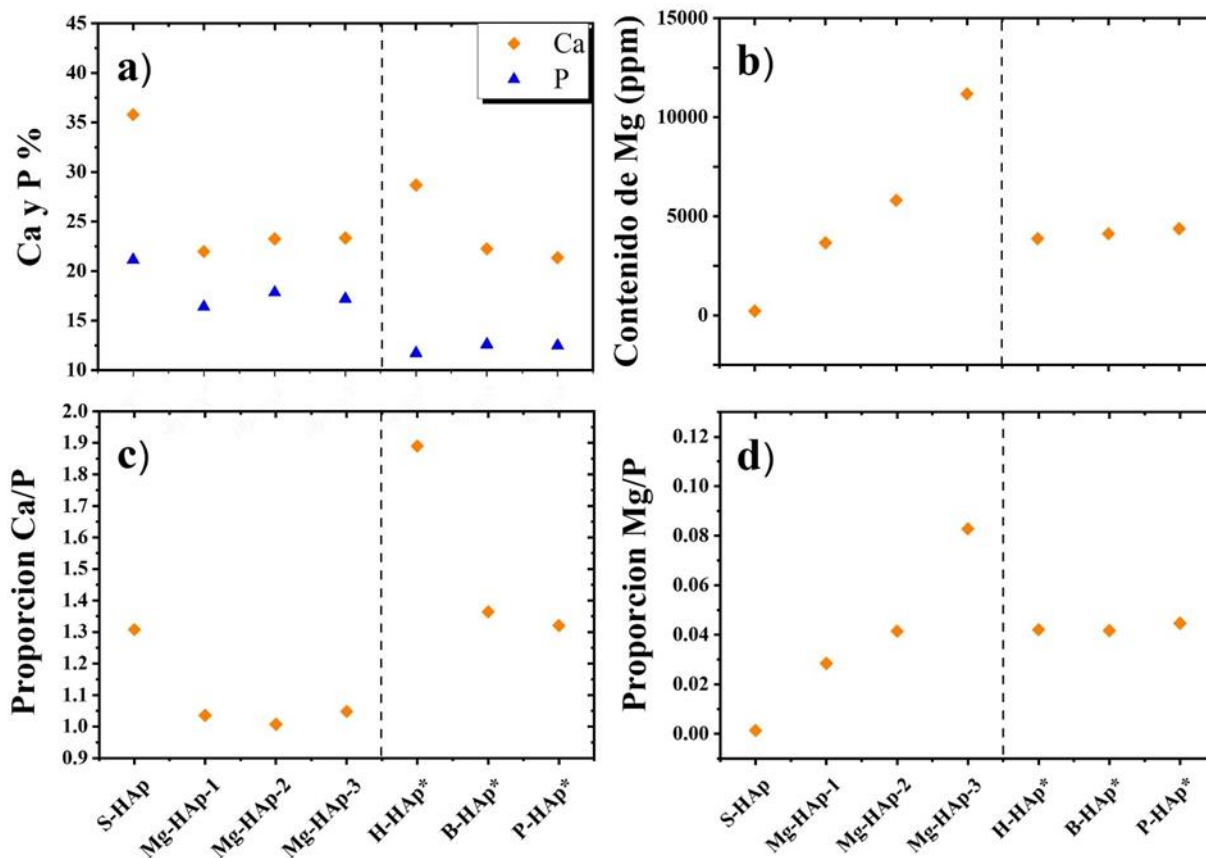


Figura 11; (a) Porcentaje de Ca y P, (b) Contenido de Mg, (c) Relación Ca / P y (d) Relación Mg / P de S-HAp Mg-HAp-1, Mg-HAp-2, Mg-HAp-3. En todos los casos, los valores de HAp humana (H-HAp *), bovina (B-HAp *) y porcina (P-HAp *) reportados por Londoño- Restrepo et al. [4] están incluidos

La hidroxiapatita estequiométrica pura tiene una relación Ca / P de 1.67, mientras que la S-HAp tiene una relación Ca/P de 1.61, lo que podría estar influenciado por la presencia de subproductos observados en los espectros de IR. Mg-HAp-1, Mg-HAp-2 y Mg-HAp-3, por otro lado, tenían una relación Ca/P más baja que S-HAp ya que el $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ creó más subproductos, según la reacción (2). Este es solo un efecto de concentración que aumenta por la calcinación. La relación Mg/P se muestra en la Figura 11 d, y la tendencia lineal verifica la incorporación de Mg como se predijo. Debido al aumento del contenido de Mg, aumenta la relación Mg / P.

Referencias

- [1]. Ghosh Somsubhra, Prasanna V. Laxmi, Sowjanya B., Srivani P., Alagaraja M., Dr. Banji David, «Inductively Coupled Plasma –Optical Emission Spectroscopy: A Review,» 2231-5667, vol. 3, nº 1, pp. 2231-5667, 2013.
- [2]. Londoño-Restrepo, S. M., Zubieta-Otero, L. F., Jeronimo-Cruz, R., Mondragon, M. A., & Rodriguez-García, M. E. (2019). Effect of the crystal size on the infrared and Raman spectra of bio hydroxyapatite of human, bovine, and porcine bones. *Journal of Raman Spectroscopy*, 50(8), 1120–1129. <https://doi.org/10.1002/jrs.5614>

Capítulo 6

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Es una técnica utilizada para el estudio de la morfología de los materiales. Consiste en la interacción de un haz de electrones producido por un filamento caliente generalmente de tungsteno y una determinada área del material a estudiar, generando diferentes señales como la de electrones secundarios y retro dispersados, los cuales se diferencian por su energía, en la Figura 12 se puede ver un esquema que muestra los componentes del equipo.

Los electrones secundarios son generados por interacciones inelásticas, tienen una energía inferior a 50 eV y son utilizados para la formación de la imagen. Mientras que los electrones retro dispersados se dan por dispersiones elásticas, responden a la composición elemental de la muestra, generando un contraste por número atómico (zonas con número atómico menor se verán más oscuras). El resultado mediante MEB será una imagen digital que dependiendo del equipo se puede lograr una resolución de hasta 5 nm.

Para el análisis las muestras deben de ser conductoras, cuando éstas no lo son se les hace un recubrimiento con algún material conductor como el oro. En algunos casos y dependiendo del

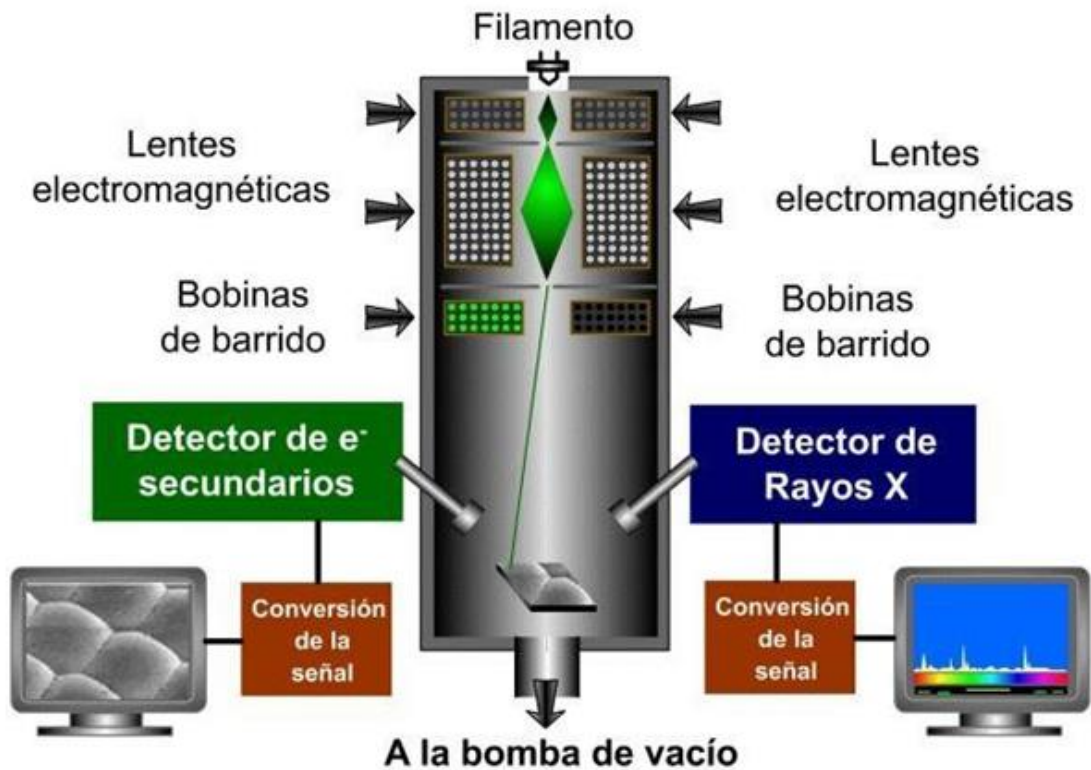


Figura 12: Esquema de microscopio electrónico de barrido con detector de rayos X para análisis de (EDS). [1]

equipo las muestras deben estar libres de humedad, por lo que en ocasiones es necesario realizarles un proceso de deshidratación [1].

6.1 Análisis morfológico: Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los cambios morfológicos de las muestras calcinadas y no calcinadas en función del Mg agregado se estudiaron mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución (HR-SEM) utilizando un microscopio electrónico de barrido por emisión de campo frío Hitachi SU8230 (Hitachi

HighTechnologies, Rexdale, ON, Canadá). (CFE-SEM) a baja tensión de aceleración (3 keV)(Figura 13).



Figura 13: Microscopio electrónico de barrido de alta resolución Hitachi SUB230

6.2 Efecto de la adición y calcinación de Mg sobre la morfología

Las imágenes HR-SEM de hidroxiapatitas no calcinadas se muestran en la Figura 14 a (S-HAp), c (Mg-HAp-1), e (Mg-HAp-2) y g (Mg-HAp-3). Sin ser calcinadas, las muestras mostraron estructuras que parecían flores densas que desaparecieron luego de ser calcinadas a 600 ° C (ver Figura 14 b, d, f y h). La presencia de estas escamas se puede atribuir a los subproductos de reacción que se produjeron y eliminados por calcinación según la Figura 8. Las Figuras 14 b, d, f y h exhiben partículas de nano cristales agregados cuya morfología fue influenciada tanto por la presencia de Mg como por la temperatura de incineración. El tamaño de los cristales de HAp producidos a partir de huesos bovinos aumenta de nano a micro durante la calcinación (400 a 900 °C), según Londoño-Restrepo et al. [2]. Sin embargo, antes de ese cambio, mientras los cristales

todavía eran nanométricos hasta los 700 °C, se produjo un evento de coalescencia. Cuando S-HAp, Mg-HAp-1, Mg-HAp-2 y Mg-HAp-3 se calcinaron a 600 °C, el tamaño de partícula aumentó, las

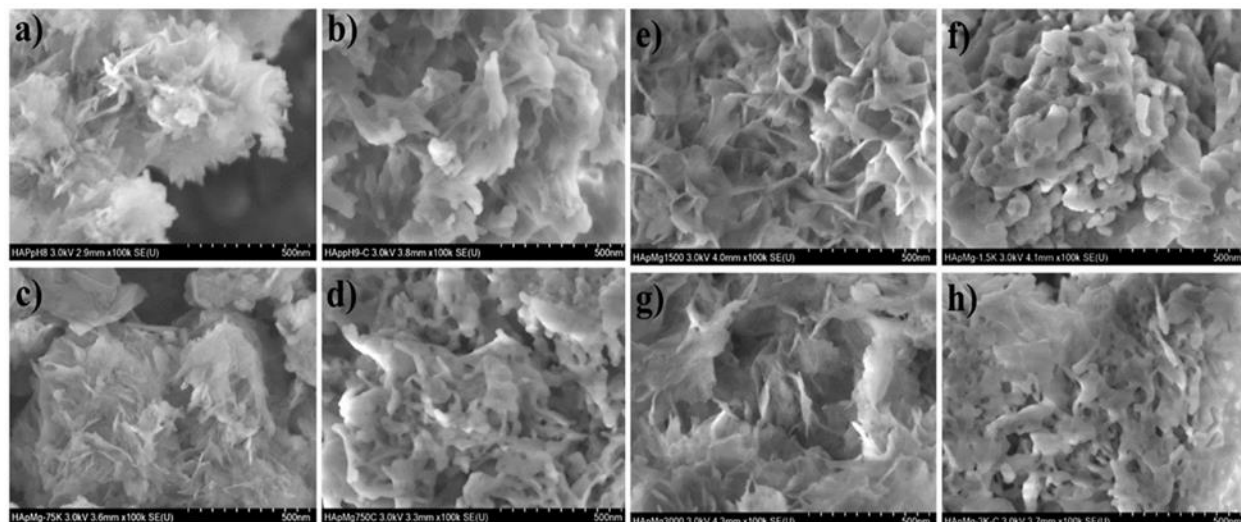


Figura 14: Imágenes SEM de (a) S-HAp; (b) C-HAp; (c) Mg-HAp-1; (d) C-Mg-HAp-1; (e) Mg-HAp-2; (f) C-Mg-HAp-2; (g) Mg-HAp-3; (h) C – Mg-HAp-3.

escamas que formaban flores desaparecieron y las muestras se convirtieron en redes unidas por coalescencia de nanocrisales que aumentaron de tamaño a medida que aumentaba la concentración de Mg.

Referencias

- [1]. Ipohorski, Miguel, and Patricia Bozzano. "Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales." *Ciencia e investigación* 63.3 (2013): 43-53.
- [2]. Londoño-Restrepo, S. M., Zubieta-Otero, L. F., Jeronimo-Cruz, R., Mondragon, M. A., & Rodriguez-García, M. E. (2019). Effect of the crystal size on the infrared and Raman spectra of bio hydroxyapatite of human, bovine, and porcine bones. *Journal of Raman Spectroscopy*, 50(8), 1120–1129. <https://doi.org/10.1002/jrs.5614>

CAPÍTULO 7

DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

La difracción de rayos x es una técnica utilizada para estudiar materiales cristalinos (y no cristalinos) mediante la medición de la forma en que difractan (dispersan) los rayos X de longitud de onda conocida.

Los rayos X se producen cuando cualquier partícula cargada eléctricamente de suficiente energía cinética desacelera rápidamente, para esto es necesario un tubo de rayos X que contenga (a) una fuente de electrones, (b) un alto voltaje de aceleración y (c) un objetivo metálico. Además, dado que la mayor parte de la energía cinética de los electrones se convierte en calor en el objetivo, este último en la mayoría de los casos se enfría con agua para evitar su fusión.

Los tubos de rayos X consisten en una envoltura de vidrio cerrado al vacío que aísla el ánodo en un extremo del cátodo en el otro, siendo el cátodo un filamento de tungsteno y el ánodo un bloque de cobre enfriado por agua, los electrodos son mantenidos a un potencial negativo alto, normalmente del orden de 30000 a 50000 voltios para trabajos de difracción. El filamento se calienta con una corriente de aproximadamente 3 amperios y emite electrones que son atraídos rápidamente hacia el objetivo por el alto voltaje a través del tubo, los electrodos son enfocados por

un alto voltaje (negativo) lo que los direcciona hacia el punto focal donde son emitidos a través de ventanas transparentes a los rayos X, generalmente hechas de berilio. En la Figura 15 se puede ver un esquema general de un tubo de rayos X.

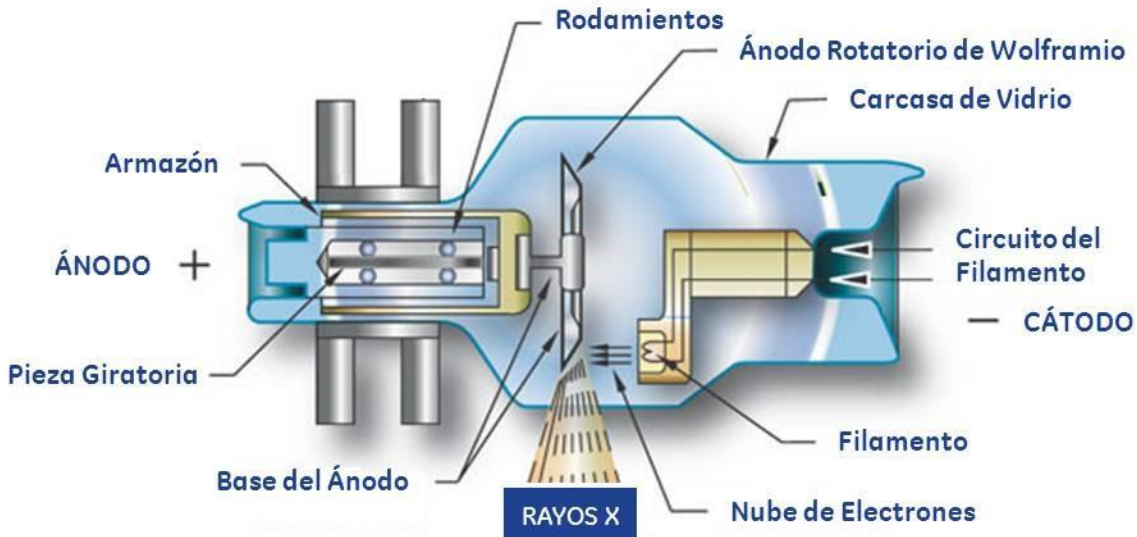


Figura 15: Tubo rayos X

Cuando se analizan los rayos que provienen del objetivo, se encuentra una mezcla de diferentes longitudes de onda, las cuales dependen del voltaje del tubo y se conoce como espectro continuo. Estos espectros son rayos X característicos del material objetivo, que constan de varios componentes, siendo los más comunes $K\alpha$ y $K\beta$. Estas son longitudes de onda específicas del material objetivo, de las cuales $K\beta$ es atenuada por un filtro hecho de un material cuyo borde de absorción de K se encuentra entre las longitudes de onda de $K\alpha$ y $K\beta$ del metal objetivo [1]. El cobre es el material objetivo más común para la difracción monocristalina, con radiación de $CuK\alpha = 1.5418 \text{ \AA}$. Estos rayos X se coliman y se dirigen sobre la muestra [2]. A medida que se rotan la muestra y el detector, registra la intensidad de los rayos X reflejados. Considerando la Figura 16, cuando dos rayos S_01 y S_02 , inciden con un ángulo θ sobre un conjunto de planos cristalinos paralelos separados por una distancia d_{hkl} .

Los electrones de los átomos situados en los puntos S_01 y S_02 son forzados a vibrar por acción del campo oscilante del haz incidente e irradian en todas las direcciones. Cuando el haz difractado es dispersado con un ángulo θ , como si fuera “reflejado” por los planos, se obtiene un máximo de intensidad si las ondas representadas por estos rayos están en fase

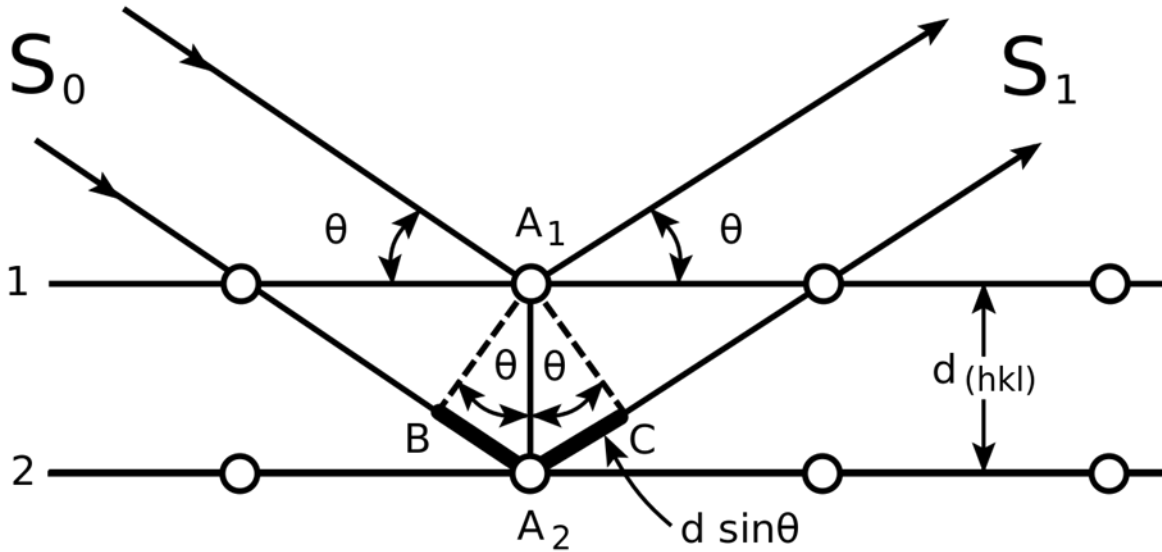


Figura 16 Deducción de la ley de Bragg

Al trazar las perpendiculares A_1B y A_1C puede verse que:

$$A_1B(A_2) = A_1C(A_2) = \theta \rightarrow BA_2 = CA_2$$

Los rayos S_{11} y S_{12} están en fase (interferencia constructiva) si la distancia extra que el rayo S_{02} debe recorrer (trayecto $S_{02} - S_{12}$) excede a la que debe recorrer el rayo S_{01} (trayecto $S_{01} - S_{11}$) en un número entero de longitudes de onda:

$$2BA_2 = n\lambda$$

Dado que $\text{sen}\theta = \frac{2BA_2}{d}$, se tiene que $n\lambda = 2d\text{sen}\theta$.

donde n es un número entero, λ es la longitud de onda de los rayos X, d es el espaciado interplanar que genera la difracción y θ es el ángulo de difracción. Cuando la geometría de los rayos X que inciden en la muestra satisface la ley de Bragg. Se produce una interferencia constructiva y aparece un pico de intensidad. Un detector registra y procesa esta señal de rayos X y convierte la señal en una tasa de conteo, que luego se envía a un dispositivo como una impresora o un monitor de computadora. La geometría de un difractómetro de rayos X es tal que la muestra gira en el camino del haz de rayos X colimado en un ángulo θ mientras que el detector de rayos X está montado en un brazo para recolectar los rayos X difractados y gira en un ángulo 2θ . [2].

7.1 Análisis estructural de las fases: difracción de rayos X (XRD)

Se utilizó XRD para determinar las fases cristalinas y los cambios en el ancho del pico a altura media (FWHM) de las muestras calcinadas y no calcinadas debido a la inclusión de Mg. Las muestras se colocaron en un soporte de aluminio. Se utilizó un difractómetro Rigaku Ultima IV (Figura 17) que funcionaba a 40 kV, 30 mA con una longitud de onda de radiación $\text{CuK}\alpha$ de $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$. Se tomaron difractogramas de 5 a 80° en una escala de 2θ y un tamaño de paso de 0.02° .

$$D_{Scherrer} = \frac{K\lambda}{\beta_T \cos\theta} \quad \text{Ec. Scherrer}$$

El cálculo del tamaño de cristalito se realizó primero utilizando la ecuación de Scherrer ($D_{Scherrer}$). En Ec. $D_{Scherrer}$ es el tamaño del cristalito (nm), β_T es el FWHM para el plano (002), al cual se le aplicó una corrección debido al error instrumental calculado utilizando el FWHM del

hexaboruro de lantano (.081), K es el factor de forma (0.9), $\lambda = 0.15406 \text{ \AA}$ es la longitud de onda de la radiación $\text{CuK}\alpha$ y θ es el ángulo en grados en radianes.

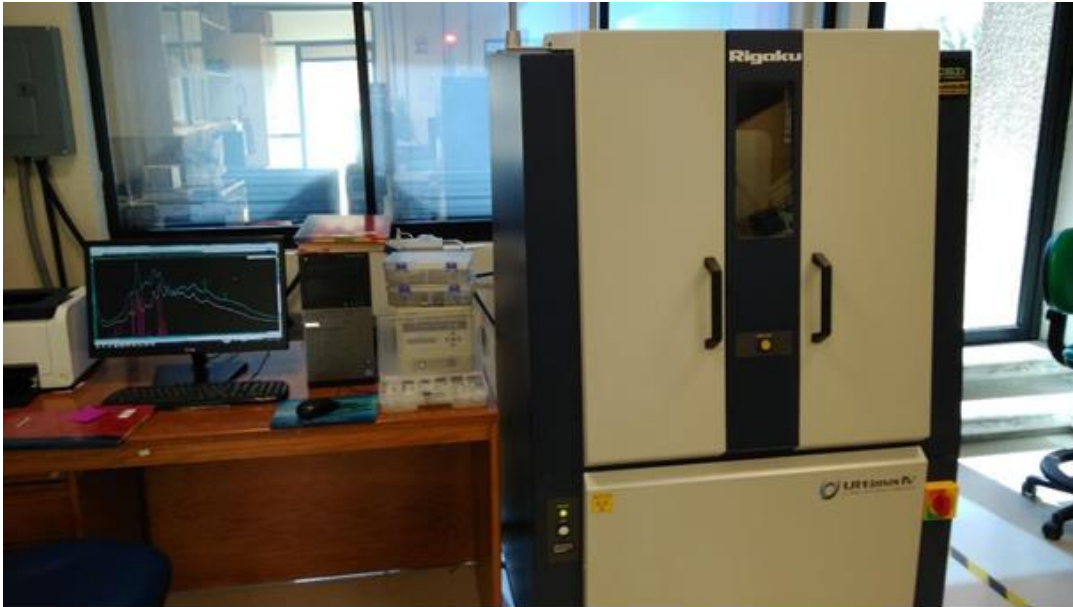


Figura 17: Ultima IV de Rigaku

7.2 Determinación de la fase cristalina

Uno de los aspectos más difíciles de integrar cualquier ion en una red en particular es saber cuál será su ubicación. Se prevé que los iones isovalentes, como el Mg ocupen posiciones de sustitución en los sitios de Ca, Las variables extrínsecas como la técnica de crecimiento, la temperatura y los tratamientos, por otro lado, pueden cambiar la ubicación de la sustitución y hacer que se ubique como un átomo intersticial. Debido a que implica cambios en los radios atómicos que conforman la red, se alteraran los parámetros cristalinos, la difracción de rayos X es una de las técnicas más utilizadas para determinar la inclusión de un ion en una red [42]. Debido a que el radio iónico de Ca^{2+} es 0,99 y 0,72 para Mg^{2+} , se predice la contracción de las dimensiones de la celda unitaria de HAp debido a la incorporación de Mg en los sitios de Ca.

Los patrones de XRD para hidroxiapatitas sintéticas no calcinadas se muestran en la Figura 18 a, que se indexaron usando la tarjeta ICDD No.00-009-0432 para hidroxiapatita. El pico a 25.879°, que corresponde al plano (002), se mueve ligeramente hacia la derecha, lo que indica que los parámetros de la red se han reducido. Debido a su valencia similar, este cambio implica que el Mg debe incluirse en los sitios de Ca. El radio atómico más bajo de Mg que Ca hace que el tamaño de la red se contraiga. Los patrones para las muestras calcinadas a 600 ° C se muestran en la Figura 18 b.

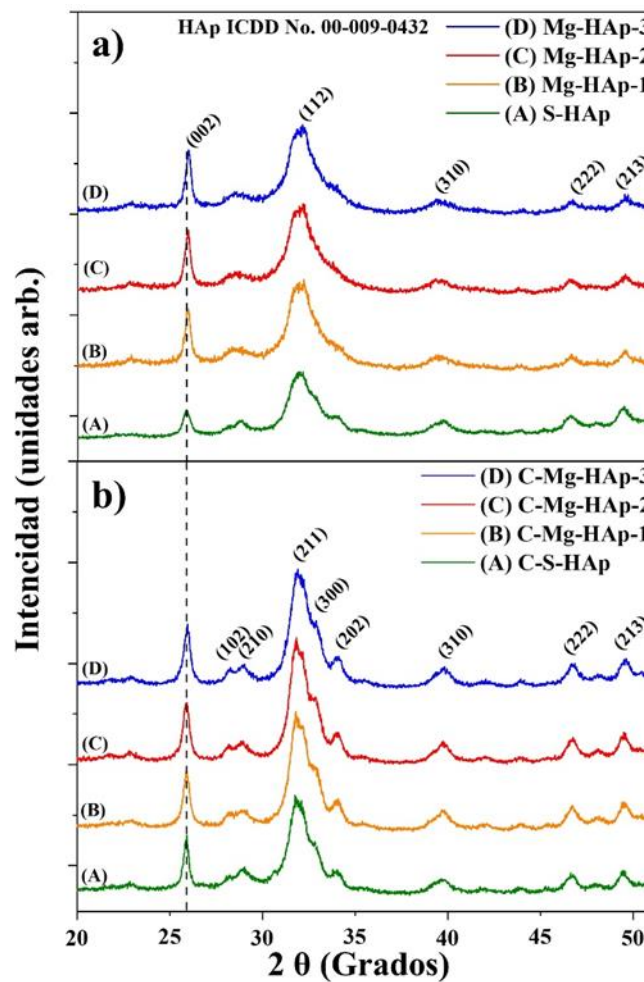


Figura 18: Patrones de difracción de rayos X de (a) sin calcinar; (b) muestras calcinadas.

7.3 Calidad cristalina y tamaño de cristal de hidroxiapatitas añadidas con Mg

El análisis del ancho del pico a altura media (FWHM) de un solo pico es uno de los enfoques más utilizados para estudiar los cambios en la estructura, la calidad cristalina y el tamaño del cristal de los materiales, el análisis del FWHM de las muestras sintetizadas se ve en la Figura 19 a. En el caso de los microcristales, una disminución del FWHM indica que los cristales son grandes. Los picos anchos (alta FWHM) en los nanocristales son causados por una dispersión elástica e inelástica simultánea, en lugar de una calidad cristalina inferior, según Lodoño-Restrepo et al. [4].

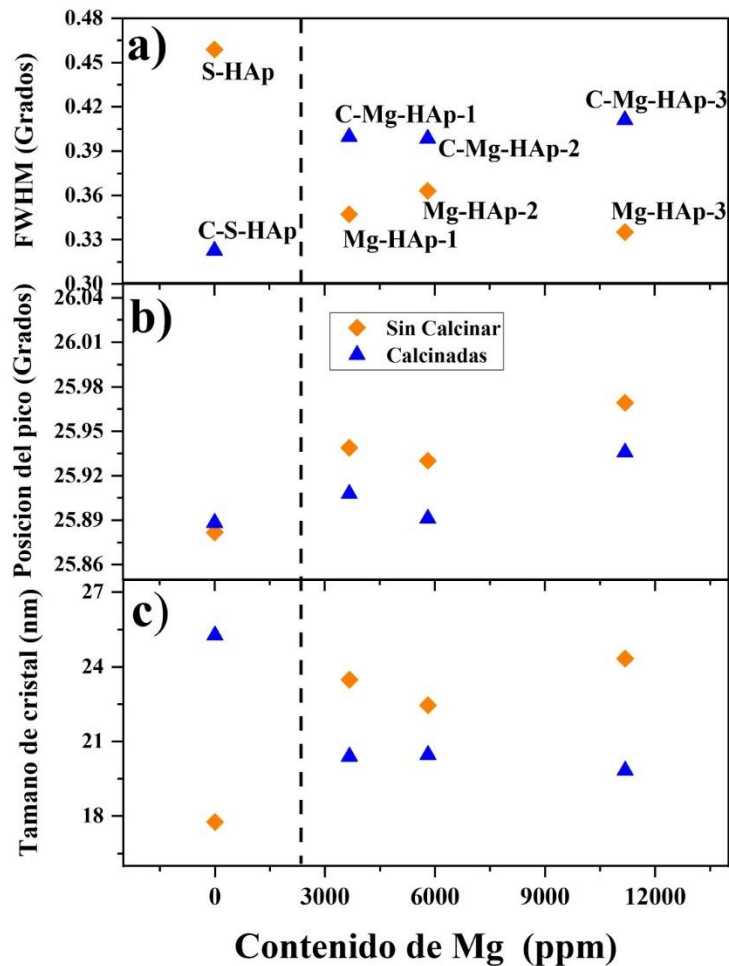


Figura 19: a) Cambios en el FWHM del avión (002); (b) Cambios en la posición máxima para el plano (002); (c) Cambios en el tamaño de los cristales para muestras con diferentes concentraciones de Mg.

La FWHM para el pico correspondiente al plano (002) para muestras de HAp sin calcinar (cuadrados rojos) y calcinadas (círculos azules) en función de la concentración de Mg se muestra en la Figura 19 b. Después de la calcinación, el FWHM de la hidroxiapatita sintética sin Mg disminuyó debido a la mejor cristalinidad, pero el tamaño del cristal aumentó (ver Figura 19 a y b). La adición de Mg, por otro lado, generó cristales de HAp más grandes lo que resulta en un decremento del FWHM como se ve en la Figura 19. Debido a que S-HAp tenía un patrón con picos mejor definidos que las hidroxiapatitas agregadas con Mg, la reducción del FWHM después de agregar Mg no debe interpretarse como un aumento en la calidad del cristal (ver Figura 19 a). La ubicación del pico para las muestras calcinadas y no calcinadas en el plano (002) como una función de la concentración de Mg se muestra en la Figura 19 b. Hubo un desplazamiento a la derecha en una muestra sin Mg, lo que indica que la red de hidroxiapatita se había encogido. Como resultado, sugiere que ocurrió una sustitución divalente, con Mg ocupando sitios de Ca con un radio más bajo. En la Figura 19 c se muestran los cálculos de tamaño de cristal derivados utilizando la ecuación de Scherrer. Después de la calcinación, el tamaño del cristal de S-HAp se redujo, como se muestra en esta imagen. Es necesario considerar que la ecuación de Scherrer no considera la calidad cristalina y los efectos combinados como los de las muestras estudiadas después de la calcinación. La recristalización produjo una disminución del FWHM lo que implica pequeños cambios en el tamaño de los cristales, esto debido al fenómeno de coalescencia de las partículas formadas por agregados policristalinos.

Referencias

- [1]. Cullity, Bernard Dennis. *Elements of X-ray Diffraction*. Addison-Wesley Publishing, 1956.
- [2]. Bunaciu, A. A., Udriștioiu, E. Gabriela, & Aboul-Enein, H. Y. (2015). X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. In *Critical Reviews in Analytical Chemistry* (Vol. 45, Issue 4, pp. 289–299). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.949616>

Capítulo 8

CALORIMETRÍA DE ESCANEEO DIFERENCIAL (DSC)

DSC es una técnica termodinámica para determinar la absorción de energía térmica directa en una muestra durante un aumento o reducción de temperatura controlada. La técnica de calorimetría se utiliza para realizar un seguimiento de los cambios en las transiciones de fase. DSC define las solas transiciones moleculares de una molécula de una conformación a otra, que se emplea con frecuencia para el estudio de procesos biológicos. Las temperaturas de transición térmica de la muestra (T_t ; puntos de fusión) también se calculan en fase de solución, sólida o mixta como suspensiones. [1]

La energía se suministra simultáneamente a una celda de muestra y una celda de referencia en un experimento de DSC. Las temperaturas de ambas celdas aumentan al mismo ritmo con el tiempo. La cantidad de exceso de calor absorbido o emitido por la molécula en la muestra sería la diferencia en la energía de entrada necesaria para hacer coincidir la temperatura de la muestra con la de la referencia. Como resultado de la presencia de la molécula de interés, se requiere más energía para

llevar la muestra a la misma temperatura que la de referencia; de ahí que entre en escena el concepto de exceso de calor. [1]

Se cree que la alteración de las fuerzas que estabilizan (Van der Waals, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, enlaces de hidrógeno, hidratación de residuos expuestos, entropía conformacional y el entorno físico) la estructura de las moléculas es la causa de los cambios. Por lo tanto, los parámetros termodinámicos obtenidos de los experimentos de DSC son bastante sensibles al estado estructural de las moléculas. Cualquier cambio en la conformación afectaría la posición, la nitidez y la forma de las transiciones en los escaneos DSC. [1]

8.1 Análisis térmico: calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La medición térmica de S-Hap, Mg-HAp-2 y Mg-HAp-3 se llevó a cabo en un sistema Calorímetro de barrido diferencial (DSC) 2 Stare de Mettler Toledo. La muestra de $9,0 \pm 0,5$ mg se puso en un crisol de alúmina y se calentó de 50 a 650 ° C a una velocidad de calentamiento de 5 ° C / min.

8.2 Eventos térmicos durante la calcinación de hidroxiapatita con Mg agregado

La Figura 20 muestra los termogramas de DSC y su segunda derivada para (a) S-HAp, (b) Mg-HAp-2 y (c) Mg-HAp-3 desde temperatura ambiente hasta 650 ° C. Estas curvas muestran los eventos endotérmicos y exotérmicos que tienen lugar debido al proceso de calentamiento. Los eventos exotérmicos se muestran con la flecha en este diagrama. La segunda derivada se utilizó para determinar la temperatura óptima para estos eventos térmicos. En la Figura 20, se encontraron seis eventos endotérmicos y se han designado de A a F. El pico A, a 67 °C, es causado por la

pérdida de agua superficial de los nitratos. La pérdida de agua de la red también es responsable del pico B (130,8 °C). El pico C (156 °C) representa la transición del nitrato de amonio de una estructura ortorrómbica a una cristalina cúbica [2]. El pico D (207 °C) está asociado con la disociación del NO₂ de los precursores de Mg y Ca de las reacciones [3]. El pico E (290 °C) se relaciona con la descomposición del nitrato de amonio [4], mientras que el pico F (305 °C) se atribuye a la descomposición sin reacción del nitrato de magnesio [5].

En la Figura 20 se ve una zona oscurecida entre 507 y 557 °C que corresponde a la coalescencia inicial de las nanopartículas de HAp, sin embargo, aún permanecen en el rango nanométrico. El

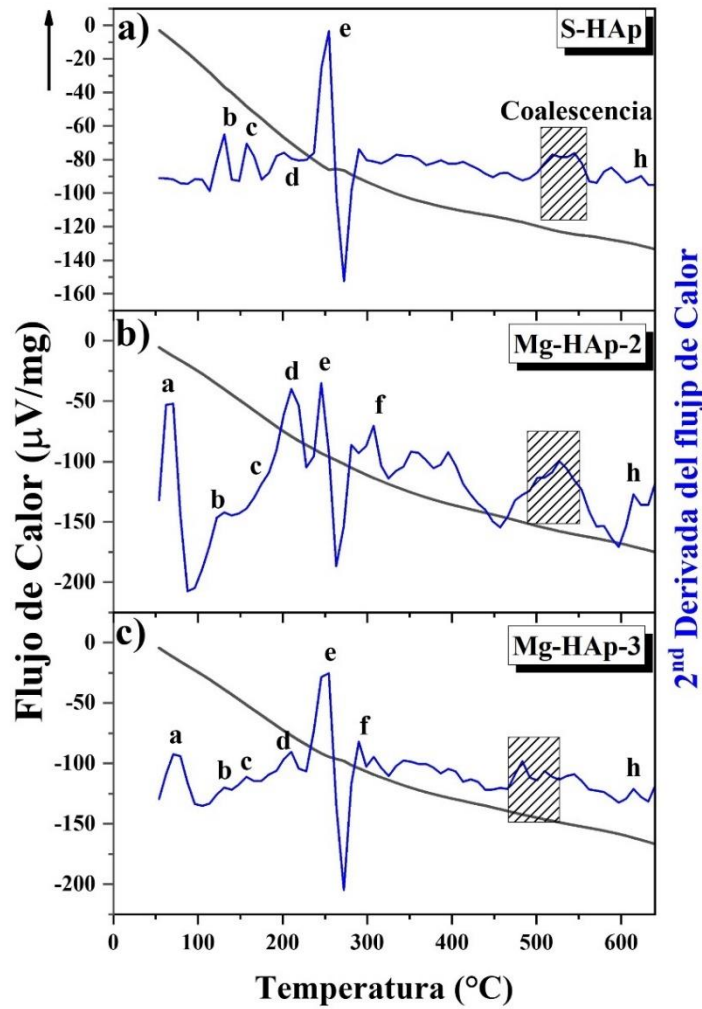


Figura 20: Termogramas DSC para (a) S-HAp; (b) Mg-HAp-2; (c) Mg-HAp-3

pico G (Fig. 20 a, b y c) corresponde al punto de fusión del nitrato de calcio [5], que es 610 ° C. Según estos datos, la calcinación de las muestras a 600 ° C provoca coalescencia y recristalización, como se ve en las Figuras 18-19.

Referencias

- [1]. Gill, P., Moghadam, T. T., & Ranjbar, B. (2010). *Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience*.
- [2]. M.E Rodríguez, A Gutiérrez, Orlando Zelaya-Angel, «Influence of crystalline quality on the thermal, optical and structural properties of Cd_{1-x}Zn_xTe for low zinc concentration,» *Journal of Crystal Growth*, vol. 233, n° 1, pp. 275-281, 2001.
- [3]. Shalini Chaturvedi, Pragnesh N. Dave , «Review on Thermal Decomposition of Ammonium Nitrate,» *Journal of Energetic Materials*, vol. 31, n° 1, pp. 1 - 26, 2013.
- [4]. L. F. Lozano, M. A. Peña-Rico, A. Heredia, J. Ocotlán-Flores,, «Thermal analysis study of human bone,» *Journal of Materials Science*, vol. 38, p. 4777–4782, 2003.
- [5]. Richard Gunawan, Sawsan Freij, Dong-ke Zhang, «A mechanistic study into the reactions of ammonium nitrate with pyrite,» *Chemical Engineering Science*, vol. 61, n° 17, pp. 5781-5790, 2006.

Capítulo 9

ESPECTROSCOPIA RAMAN

La espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de los materiales. Este análisis se basa en hacer incidir un haz de luz monocromática de frecuencia ν_0 sobre una muestra cuyas características moleculares se desean determinar, y examinar la luz dispersada de dicha muestra. Aquí una porción de la luz es dispersada de forma inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia (dispersión Raman) que son característicos del material analizado e independientes de la frecuencia de la luz incidente. (1). Las nuevas frecuencias $+\nu_r$ y $-\nu_r$, son las frecuencias Raman, características de la naturaleza química y el estado físico de la muestra e independientes de la radiación incidente. Los iones y átomos que forman las moléculas están sometidos a movimientos rotacionales y vibracionales, cada uno de estos movimientos le corresponde un valor determinado de energía molecular. A continuación, se puede ver una representación gráfica (Figura 21) [1].

La dispersión provocada por el haz incidente se puede interpretar con el proceso siguiente: el fotón incidente lleva a la molécula a un nivel de energía vibracional (o rotacional) superior no permitido, el cual abandona rápidamente para pasar a uno de los niveles permitidos emitiendo un fotón.

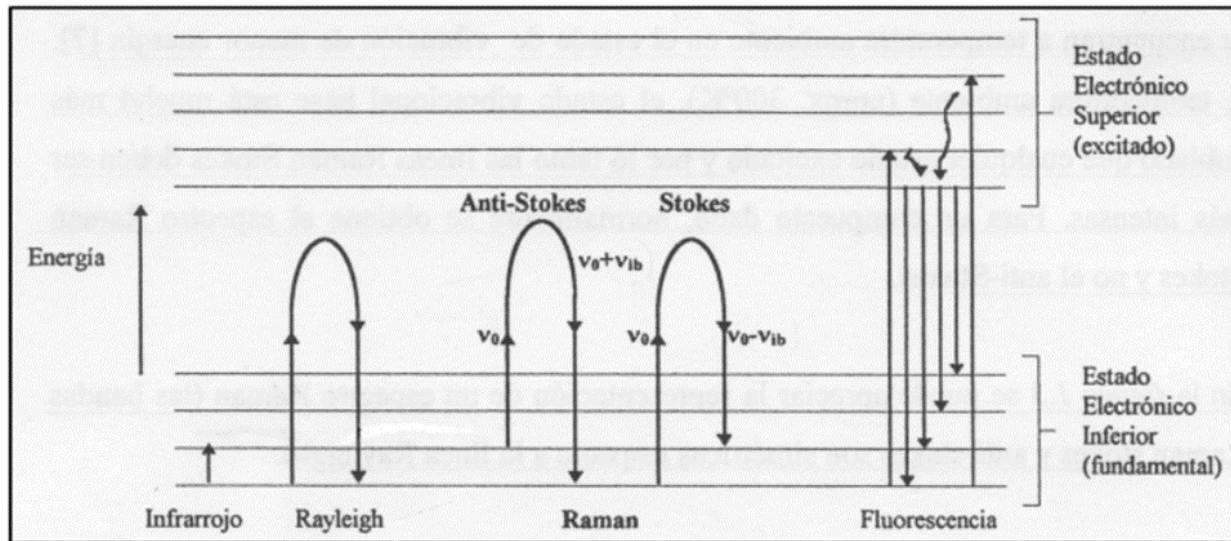


Figura 21: Diagrama energético en el que las líneas horizontales representan estados vibracionales y se muestran transiciones entre estados energéticos para diferentes interacciones luz-materia.[1]

la frecuencia a la cual es liberado este fotón dependerá del salto energético realizado por la molécula.

Hay dos casos:

- Si el fotón resultante de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a la misma frecuencia que el fotón incidente, el choque es elástico que ni el fotón ni la molécula sufren variaciones lo que se conoce como dispersión de Rayleigh.
- Si el fotón resultante de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a una frecuencia distinta del incidente, el choque es inelástico y pueden darse dos fenómenos:
 - a) Si el fotón dispersado tiene una frecuencia menor a la del incidente, se dice que es una dispersión Raman Stokes ($\nu_0 - \nu_r$); en esta se produce una transferencia de

energía del fotón a la molécula que después de saltar al estado de energía no permitido vuelve a uno permitido mayor al que tenía inicialmente.

- b) Si el fotón dispersado tiene una frecuencia mayor a la del incidente, se dice que es una dispersión Raman anti-Stokes ($\nu_0 + \nu_r$); en esta la molécula antes del choque no se encontraba en su estado vibracional fundamental sino en uno de mayor energía y después del choque pasa a este estado.

De acuerdo con el conjunto de valores ν_r , característicos de la estructura poliatómica y de la naturaleza de los enlaces químicos que forman al material analizado, se generan los datos resultantes [1].

9.1 Espectroscopia Raman

Las muestras de las series S-HAp, C-HAp (sin adición de Mg) y Mg-HAp y C-Mg-HAp (con adición de Mg) antes y después de la calcinación se analizaron utilizando un espectrómetro Senterra Raman de Bruker, equipado con un láser de 785 nm y un microscopio Olympus. Se utilizó un objetivo de 20 ×. El rango espectral medido fue de 940 a 980 cm^{-1} con una resolución de 3 cm^{-1} . Los parámetros del instrumento fueron una apertura de 50 μm , 100 mW de potencia láser, tiempo de integración de 6 segundos y seis escaneos.

9.2 Análisis de calidad cristalina por espectroscopia Raman

La caracterización por Raman nos sirve para corroborar la síntesis de la HAp con las bandas ubicadas en 1047 cm^{-1} [2], 960 cm^{-1} [3], 590 cm^{-1} [4] y 431 cm^{-1} [5] que podemos observar tanto en las muestras calcinadas (Figura 22 b) como en las no calcinadas (Figura 22 a).

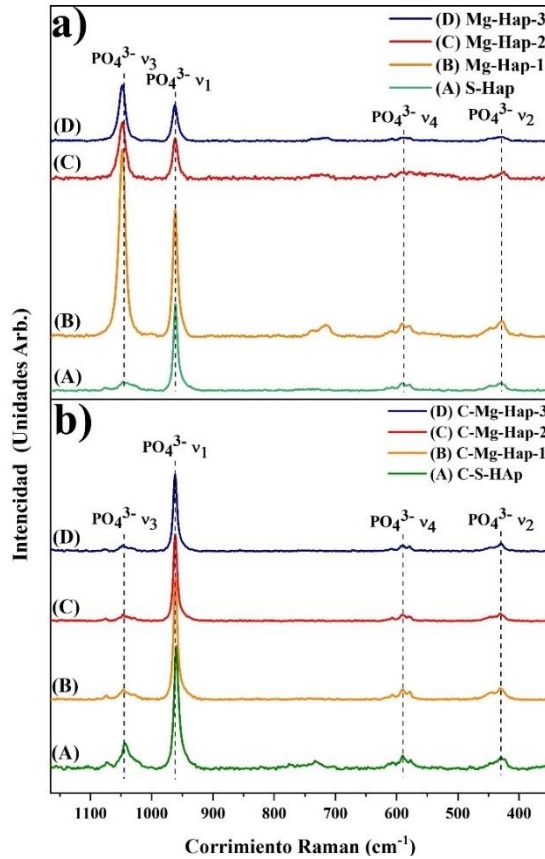


Figura 22: Espectroscopia Raman

La banda de PO_4^{3-} se muestra en la Figura 21 a y b para las muestras calcinadas y no calcinadas, respectivamente. Esta banda, típica de HAp y que se ha utiliza para evaluar la calidad de la muestra, se sitúa a unos 960 cm^{-1} , ya que es una banda . La intensidad de esta banda disminuyó a medida que aumentaba el contenido de Mg en las muestras sin calcinar.

Es importante recordar que las muestras sin calcinar contenían NH_4NO_3 , por lo que la caída del FWHM fue por efecto de concentración. Los subproductos se eliminaron de la HAp después de la calcinación y el efecto de concentración, como se indicó anteriormente, desapareció. Los valores bajos de FWHM en Raman y la difracción de rayos X pueden relacionarse con una mejor calidad

cristalina y el gran tamaño del cristal. Dado que ambos conjuntos de muestras eran nanométricos, los resultados estaban completamente relacionados con la calidad de los cristales de HAp.

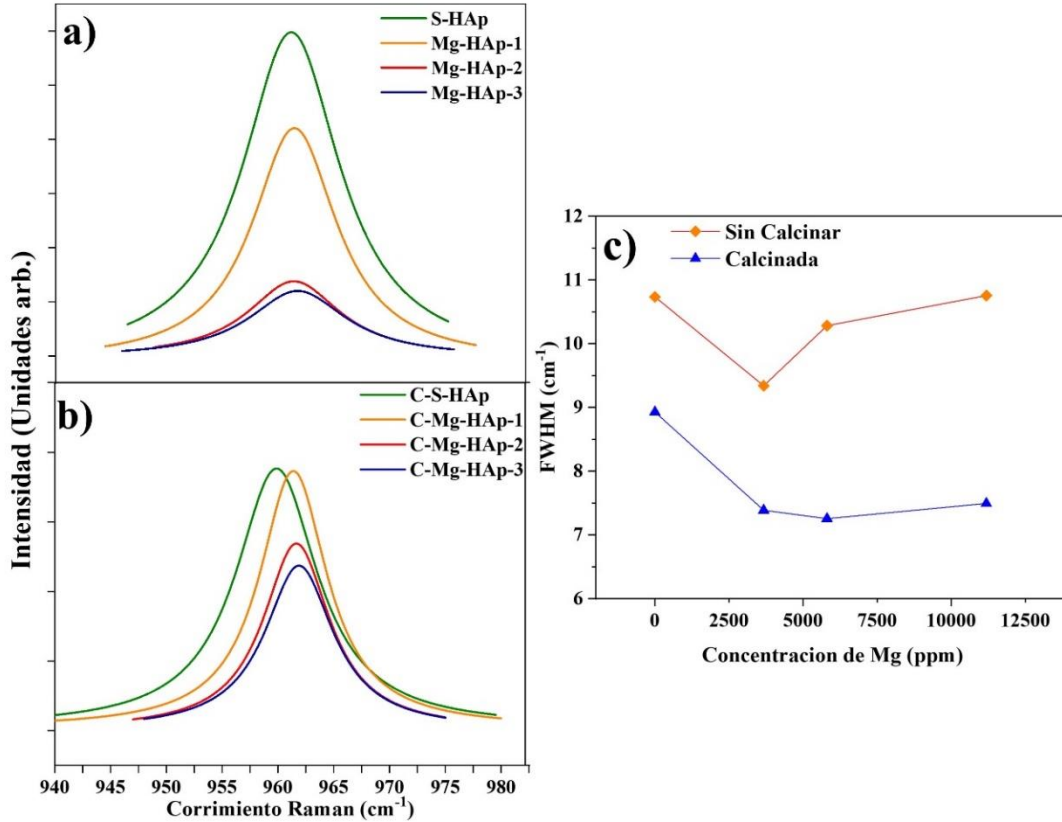


Figura 23: Espectros Raman para (a) sin calcinar; (b) muestras sintéticas calcinadas; (c) FWHM del cambio Raman en 960 cm⁻¹

La calidad de las muestras calcinadas mejoró a medida que aumentó la concentración de Mg, siendo la muestra con mayor contenido de Mg la mejor (Figura 21). Este hallazgo es consistente con las imágenes SEM, que revelaron una red interconectada de nanocristales facetados basados en patrones de difracción de rayos X.

Referencias

- [1]. Thomas Dieing, Olaf Hollricher, Confocal Raman Spectroscopy, W. T. Rhodes, Atlanta: Springer, 2011.
- [2]. Londoño-Restrepo SM, Ramirez-Gutierrez CF, del Real A, Rubio-Rosas E, Rodriguez-García ME. Study of bovine hydroxyapatite obtained by calcination at low heating rates and cooled in furnace air. *J Mater Sci* 2016; 51:4431–4441, <https://doi.org/10.1007/s10853-016-9755-4>.
- [3]. Londoño-Restrepo SM, Zubieta-Otero LF, Jeronimo-Cruz R, Mondragon MA, Rodriguez-García ME. Effect of the crystal size on the infrared and Raman spectra of bio hydroxyapatite of human, bovine, and porcine bones. *J. Raman Spectrosc.* (2019), <https://doi.org/10.1002/jrs.5614>.
- [4]. P. N. de Aza, F. Guitián and, Santos C, Aza S de, and RC, Artús L. Vibrational Properties of Calcium Phosphate Compounds. 2. Comparison between Hydroxyapatite and β -Tricalcium Phosphate. (1997), <https://doi.org/10.1021/cm9604266>.
- [5]. Penel G, Delfosse C, Descamps M, Leroy G. Composition of bone and apatite biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy. *Bone* 2005; 36:893–901, <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.02.012>.

Capítulo 10

CONCLUSIONES

- El método de precipitación química vía húmeda, permitió obtener nano hidroxiapatitas cristalinas con diferentes contenidos de magnesio.
- El contenido de Mg varía entre 3600 y 11200 ppm, que esta en el rango concentración de huesos humanos, según los hallazgos de ICP. Sin embargo, incluir más de 11000 ppm de Mg en la red de HAp tiene un efecto sobre la morfología y el tamaño de los cristales de HAp. Como resultado, se recomienda agregar Mg en un rango de 3600 a 5800 ppm.
- El FWHM de la Hap se redujo debido a un proceso de recristalización, sin embargo, el tamaño del cristal no creció considerablemente ya que permaneció en el rango nanométrico, según los estudios de difracción de rayos X.
- Los procesos de recristalización y coalescencia que ocurren durante la calcinación a 600 °C provocan cambios en las características morfológicas y estructurales de la HAp, que son verificadas por DSC, espectroscopía Raman y rayos X.

- Para trabajos futuros se recomienda seguir la misma metodología de síntesis para la inclusión de iones como sodio y potasio, pero modifican dando el tamaño de la gota reduciéndolo para de este modo provocar una reacción más uniforme.

Anexos

PDF de Hidroxiapatita

00-009-0432

Oct 14, 2021 4:00 PM (Mario Rodriguez)

Status: Primary Quality Mark: Indexed Environment: Ambient Temp: 298.0 K (Assigned by ICDD editor)
 Chemical Formula: Ca₅(P O₄)₃(OH) Empirical Formula: Ca₅H O₁₃P₃ Weight %: Ca39.90 H0.20 O41.41 P18.50
 Atomic %: Ca22.73 H4.55 O59.09 P13.64 Compound Name: Calcium Phosphate Hydroxide
 Mineral Name: Hydroxylapatite, syn CAS Number: 1306-06-5 Entry Date: 09/01/1959

Radiation: CuKα1 (1.5406 Å) Camera Diameter: 114.60 mm d-Spacing: Guinier

Crystal System: Hexagonal SPGR: P6₃/m (176)
 Author's Unit Cell [a: 9.418 Å c: 6.884 Å Volume: 528.80 Å³ Z: 2.00 MolVol: 264.40 c/a: 0.731]
 Calculated Density: 3.155 g/cm³ Measured Density: 3.08 g/cm³
 Color: Green, bluish green, yellow-green, grayish green, violet, violet-blue, violet, colorless, light greenish white, gray, brown,
 SS/FOM: μ_F(30) = 54.3(0.0158, 35)

Space Group: P6₃/m (176) Molecular Weight: 502.31 g/mol
 Crystal Data [a: 9.418 Å b: 9.418 Å c: 6.884 Å α: 90.00° β: 90.00° γ: 120.00° XtiCell Vol: 528.80 Å³
 XtiCell Z: 2.00 c/a: 0.731 a/b: 1.000 c/b: 0.731]
 Reduced Cell [a: 6.884 Å b: 9.418 Å c: 9.418 Å α: 120.00° β: 90.00° γ: 90.00° RedCell Vol: 528.80 Å³]

μ_B: -1.651 ε_γ: -1.644 Sign: --

Atomic parameters are cross-referenced from PDF entry 04-011-9308

Space Group Symmetry Operators:

Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator
1	x,y,z	4	y,-x+y,-z	7	-x,-y,z+1/2
2	-x,-y,-z	5	-x+y,-x,z	8	x,y,-z+1/2
3	-y,x-y,z	6	x-y,x,-z	9	y,-x+y,z+1/2
				10	-y,x-y,-z+1/2
				11	x-y,x,z+1/2
				12	-x+y,-x,-z+1/2

ADP Type: U

Atomic Coordinates:

Atom	Num	Wyckoff	Symmetry	x	y	z	SOF	U _{iso}	AET
O	1	6h	m..	0.3273	0.4841	0.25	1.0	0.011	
O	2	6h	m..	0.5809	0.4649	0.25	1.0	0.0145	
O	3	12l	1	0.3430	0.258	0.0705	1.0	0.0224	
O	4	4e	3..	0.0	0.0	0.1975	0.48	0.015	
H	5	4c	3..	0.0	0.0	0.054	0.348	0.023	
Ca	6	4f	3..	0.33333	0.66666	0.0016	1.0	0.0103	
Ca	7	6h	m..	0.246	0.5923	0.25	1.0	0.0105	
P	8	6h	m..	0.3982	0.3684	0.25	1.0	0.0078	

Crystal (Symmetry Allowed): Centrosymmetric AC Space Group: P6₃/m (176)
 AC Unit Cell [a: 9.41844(3) Å b: 9.41844(3) Å c: 6.88374(3) Å α: 90° β: 90° γ: 120°]

Subfiles: Ceramic (Bioceramic), Common Phase, Forensic, Inorganic, Mineral Related (Mineral, Synthetic), Pharmaceutical (Excipient)

Mineral Classification: Apatite (group), phosphate (subgroup) Pearson Symbol: hP44.00
 Pearson Symbol w/o H: hP42 ANX: A3B5X13

Cross-Ref PDF #'s: 00-034-0010 (Deleted), 01-073-0293 (Alternate), 01-073-1731 (Alternate), 01-074-0565 (Primary),
 01-084-1998 (Alternate), 01-089-4405 (Alternate), 04-007-2837 (Primary), 04-010-6314 (Alternate),
 04-010-6315 (Alternate), 04-011-9308 (Primary)

References:

Type	DOI	Reference
Primary Reference		de Wolff, P., Technisch Physische Dienst, Delft, The Netherlands. ICDD Grant-in-Aid.
Crystal Structure		Crystal Structure Source: LFF.
Optical Data		Dana's System of Mineralogy, 7th Ed., II, 879.

Database Comments: Additional Patterns: See PDF 01-073-0293, 01-073-1731, 01-074-0565, 01-074-566, 01-076-0694 and 01-084-1998. To replace 00-034-0010. ANX: A3B5X13. General Comments: I/11 are peak values from a pattern which shows slight broadening of prism reflections. Validated by calculated data 00-024-0033. Sample Source or Locality: Sample obtained following the procedure indicated by Hodge et al., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 10 156 (1938). Warning: Lines with abs(delta 2Theta)>0.06 DEG. Unit Cell Data Source: Powder Diffraction.

d-Spacings (56) - Ca₅(P O₄)₃(OH) - 00-009-0432 (Stick, Fixed Slit Intensity) - Cu Kα1 1.54056 Å

2θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	*	2θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	*
10.81994	8.170000	12	1	0	0		16.84147	5.260000	0	1	0	1	

© 2021 International Centre for Diffraction Data. All rights reserved.

Page 1 / 2

00-009-0432

Oct 14, 2021 4:00 PM (Mario Rodriguez)

2θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	*	2θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	*
18.78478	4.720000	4	1	1	0		53.14336	1.722000	20	0	0	4	
21.81897	4.070000	10	2	0	0		54.44033	1.684000	4	1	0	4	
22.90153	3.880000	10	1	1	1		55.87915	1.644000	10	3	2	2	
25.35381	3.510000	2	2	0	1		57.12770	1.611000	8	3	1	3	
25.87859	3.440000	40	0	0	2		58.07325	1.587000	4	5	0	1	
28.12622	3.170000	12	1	0	2		59.93823	1.542000	6	4	2	0	
28.96578	3.080000	18	2	1	0		60.45716	1.530000	6	3	3	1	
31.77285	2.814000	100	2	1	1		61.66033	1.503000	10	2	1	4	
32.19570	2.778000	60	1	1	2		63.01068	1.474000	12	5	0	2	
32.90151	2.720000	60	3	0	0		63.44267	1.462000	4	5	1	0	
34.04783	2.631000	25	2	0	2		64.07793	1.452000	13m	3	0	4	
35.48016	2.528000	6	3	0	1		64.07793	1.452000	13m	3	2	3	
39.20441	2.296000	8	2	1	2		65.03126	1.433000	9	5	1	1	
39.81840	2.262000	20	3	1	0		66.38623	1.407000	4m	4	1	3	
40.45238	2.228000	2	2	2	1		66.38623	1.407000	4m	4	2	2	
42.02890	2.148000	10	3	1	1		69.69922	1.348000	3	5	1	2	
42.31783	2.134000	4	3	0	2		71.63108	1.316000	3m	4	0	4	
43.80360	2.062000	8	1	1	3		71.63108	1.316000	3m	4	3	1	
44.36874	2.040000	2	4	0	0		72.28576	1.306000	4m	2	0	5	
45.30486	2.000000	6	2	0	3		72.28576	1.306000	4m	5	2	0	
46.71144	1.943000	30	2	2	2		73.99515	1.280000	7	4	2	3	
48.10274	1.890000	16	3	1	2		75.02247	1.265000	3m	3	2	4	
48.62262	1.871000	6	3	2	0		75.02247	1.265000	3m	6	0	2	
49.46761	1.841000	40	2	1	3		75.38337	1.257000	9	2	1	5	
50.49276	1.806000	20	3	2	1		76.15363	1.249000	1	4	3	2	
51.28335	1.780000	12	4	1	0		77.17492	1.235000	11	5	1	3	
52.10011	1.754000	16	4	0	2		78.22719	1.221000	9	5	2	2	

PDF de Nitrato de Amonio

00-009-0432

Oct 14, 2021 4:00 PM (Mario Rodriguez)

Status: Primary Quality Mark: Indexed Environment: Ambient Temp: 298.0 K (Assigned by ICDD editor)
 Chemical Formula: $\text{Ca}_5(\text{P O}_4)_3(\text{O H})$ Empirical Formula: $\text{Ca}_5\text{H O}_{13}\text{P}_3$ Weight %: Ca39.90 H0.20 O41.41 P18.50
 Atomic %: Ca22.73 H4.55 O59.09 P13.64 Compound Name: Calcium Phosphate Hydroxide
 Mineral Name: Hydroxylapatite, syn CAS Number: 1306-06-5 Entry Date: 09/01/1959

Radiation: $\text{CuK}\alpha_1$ (1.5406 Å) Camera Diameter: 114.60 mm d-Spacing: Guinier

Crystal System: Hexagonal SPGR: $\text{P6}_3/\text{m}$ (176)
 Author's Unit Cell [a: 9.418 Å b: 6.884 Å c: 6.884 Å³ Volume: 528.80 Å³ Z: 2.00 MolVol: 264.40 c/a: 0.731]
 Calculated Density: 3.155 g/cm³ Measured Density: 3.08 g/cm³
 Color: Green, bluish green, yellow-green, grayish green, violet, violet-blue, violet, colorless, light greenish white, gray, brown,
 SS/FOM: $\mu_{\text{F}}(30) = 54.3(0.0158, 35)$

Space Group: $\text{P6}_3/\text{m}$ (176) Molecular Weight: 502.31 g/mol
 Crystal Data [a: 9.418 Å b: 9.418 Å c: 6.884 Å α: 90.00° β: 90.00° γ: 120.00° XtlCell Vol: 528.80 Å³
 XtlCell Z: 2.00 c/a: 0.731 a/b: 1.000 c/b: 0.731]
 Reduced Cell [a: 6.884 Å b: 9.418 Å c: 9.418 Å α: 120.00° β: 90.00° γ: 90.00° RedCell Vol: 528.80 Å³]

$\mu_{\text{F}} = 1.651$ $\epsilon_{\text{F}} = 1.644$ Sign: --

Atomic parameters are cross-referenced from PDF entry 04-011-9308

Space Group Symmetry Operators:

Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator
1	x,y,z	4	y,-x+y,-z	7	-x,-y,z+1/2	10	-y,x-y,-z+1/2
2	-x,-y,-z	5	-x+y,-x,z	8	x,y,-z+1/2	11	x-y,x,z+1/2
3	-y,x-y,z	6	x-y,x,-z	9	y,-x+y,z+1/2	12	-x+y,-x,-z+1/2

ADP Type: U

Atomic Coordinates:

Atom	Num	Wyckoff	Symmetry	x	y	z	SOF	Uiso	AET
O	1	6h	m..	0.3273	0.4841	0.25	1.0	0.011	
O	2	6h	m..	0.5809	0.4849	0.25	1.0	0.0145	
O	3	12i	1	0.3430	0.258	0.0705	1.0	0.0224	
O	4	4e	3..	0.0	0.0	0.1975	0.48	0.013	
H	5	4e	3..	0.0	0.0	0.054	0.348	0.023	
Ca	6	4f	3..	0.33333	0.66666	0.0016	1.0	0.0103	
Ca	7	6h	m..	0.246	0.9923	0.25	1.0	0.0105	
P	8	6h	m..	0.3982	0.3684	0.25	1.0	0.0078	

Crystal (Symmetry Allowed): Centrosymmetric AC Space Group: $\text{P6}_3/\text{m}$ (176)
 AC Unit Cell [a: 9.41844(3) Å b: 9.41844(3) Å c: 6.88374(3) Å α: 90° β: 90° γ: 120°]

Subfiles: Ceramic (Bioceramic), Common Phase, Forensic, Inorganic, Mineral Related (Mineral, Synthetic), Pharmaceutical (Excipient)

Mineral Classification: Apatite (group), phosphate (subgroup) Pearson Symbol: hP44.00

Pearson Symbol w/o H: hP42 ANX: A3B5X13

Cross-Ref PDF #'s: 00-034-0010 (Deleted), 01-073-0293 (Alternate), 01-073-1731 (Alternate), 01-074-0565 (Primary), 01-084-1998 (Alternate), 01-089-4405 (Alternate), 04-007-2837 (Primary), 04-010-6314 (Alternate), 04-010-6315 (Alternate), 04-011-9308 (Primary)

References:

Type	DOI	Reference
Primary Reference		de Wolff, P., Technisch Physische Dienst, Delft, The Netherlands. ICDD Grant-in-Aid.
Crystal Structure		Crystal Structure Source: LFF.
Optical Data		Dana's System of Mineralogy, 7th Ed., II, 879.

Database Comments: Additional Patterns: See PDF 01-073-0293, 01-073-1731, 01-074-0565, 01-074-566, 01-076-0694 and 01-084-1998. To replace 00-034-0010. ANX: A3B5X13. General Comments: I/11 are peak values from a pattern which shows slight broadening of prism reflections. Validated by calculated data 00-024-0033. Sample Source or Locality: Sample obtained following the procedure indicated by Hodge et al., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 10 156 (1938). Warning: Lines with $\text{abs}(\Delta 2\theta) > 0.06$ DEG. Unit Cell Data Source: Powder Diffraction.

d-Spacings (56) - $\text{Ca}_5(\text{P O}_4)_3(\text{O H})$ - 00-009-0432 (Stick, Fixed Slit Intensity) - $\text{Cu K}\alpha_1$ 1.54056 Å

2θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	*	2θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	*
10.81994	8.170000	12	1	0	0		16.84147	5.260000	0	1	0	1	

© 2021 International Centre for Diffraction Data. All rights reserved.

Page 1 / 2

© 2021 International Centre for Diffraction Data. All rights reserved.

Page 1 / 2

00-008-0452

Oct 14, 2021 4:03 PM (Mario Rodriguez)

d-Spacings (2 θ) - N H4 N O3 - 00-008-0452 (Stick, Fixed Silt Intensity) - Cu K α 1 1.54056 Å

2 θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	*	2 θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	*
17.90460	4.950000	45	1	0	0		51.09863	1.780000	4	1	0	3	
22.43280	3.960000	65	0	1	1		51.62563	1.709000	<1	2	1	2	
24.29851	3.660000	2	1	1	0		52.87898	1.730000	4	0	3	1	
28.89867	3.087000	100	1	1	1		56.36410	1.631000	6	1	3	1	
31.03721	2.875000	10	0	0	2		58.43640	1.578000	6	3	1	0	
32.87665	2.722000	75	0	2	0		61.20883	1.513000	2	2	0	3	
36.11507	2.485000	10	1	0	2		62.16523	1.492000	2	1	2	3	
37.76726	2.380000	8	1	2	0		63.49105	1.464000	2	1	3	2	
39.83513	2.260000	45	1	1	2		63.63670	1.461000	2	2	3	0	
40.03839	2.249000	2	2	1	0		64.98033	1.434000	<1	0	0	4	
43.16629	2.094000	2	2	1	1		65.54533	1.423000	2	3	0	2	
45.83729	1.978000	4	0	2	2		67.69207	1.383000	<1	3	1	2	
49.64028	1.835000	2	1	2	2		67.83921	1.380000	2	1	0	4	

Primer artículo publicado: Synthesis and characterization of bioinspired nano-hydroxyapatite by wet chemical precipitation

Progress in Natural Science: Materials International 31 (2021) 575–582



Original Research

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



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

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

^b Departamento de Nanotecnología, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Arajquillo, Querétaro, Qro, 76230, México

ARTICLE INFO

Keywords:
Magnesium
Physicochemical properties
Calcination
Nanometric crystal size
Coalescence
Recrystallization

ABSTRACT

Biogenic hydroxyapatites from mammalian bones naturally contain traces of ions, like Mg, which play a vital role in the bone remodeling process. In this way, synthetic hydroxyapatites should include this kind of mineral. In this work, hydroxyapatite added with Mg was synthesized by wet precipitation using $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, and $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0, 0.032, 0.061, and 0.123 M). Inductively coupled plasma and X-ray diffraction evidenced the Mg inclusion in the hydroxyapatite lattice in the same levels reported for natural hydroxyapatites. The calcination at 600 °C was performed to remove the reaction by-products, but it also gave rise to physicochemical changes as the coalescence and crystals recrystallization. It produced, in turn, an improvement in the crystalline quality, according to Raman analysis. Despite those physicochemical changes, all the samples remained nanometric according to scanning electron microscopy imaging.

1. Introduction

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

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

Magnesium (Mg) is the second most abundant substitutional ion in the bone and the fourth in the body [10]. About 05% of this mineral is found in bone and teeth. In human, bovine, and porcine bones, Mg concentration has been determined by different quantitative techniques, and inductively coupled plasma (ICP) measures reported that for an adult human bone, the Mg concentration is in the range from 3000 to 6000 ppm [3]. In comparison, other reports using the semi-quantitative method show higher values up to 14000 ppm by X-ray fluorescence [11]. Inductively coupled plasma (ICP) measures reported that for adult human bone, the concentration of Mg ranges from 3000 to 6000 ppm [3], while other reports using the semi-quantitative method show higher

* Corresponding author.

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

<https://doi.org/10.1016/j.pnsci.2021.06.006>

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

Available online 25 June 2021

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

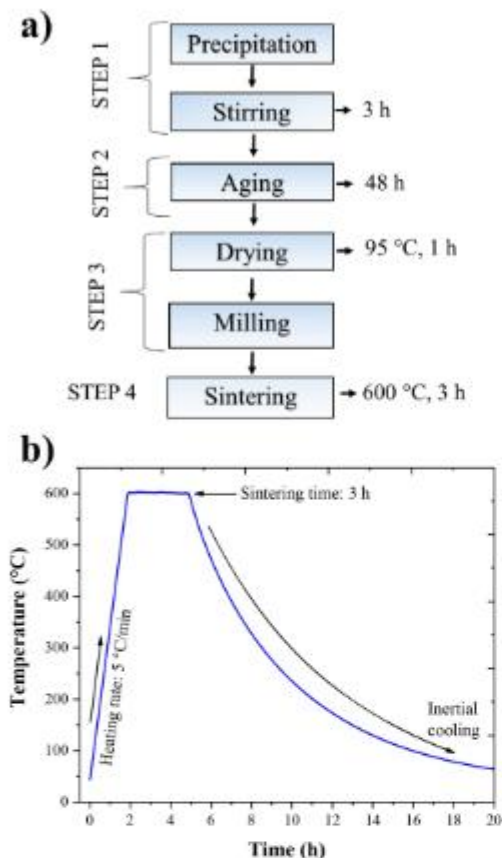


Fig. 1. (a) Block diagram of the process to obtain synthetic HAp; (b) The thermal history for the annealing process in synthetic HAp.

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

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

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

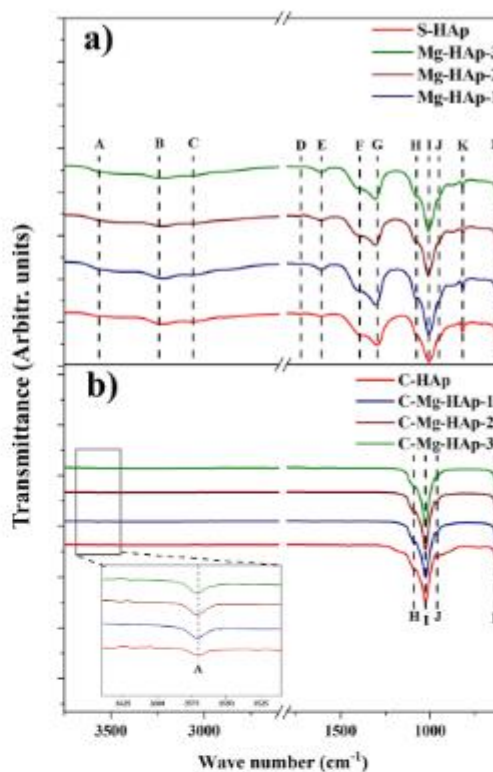


Fig. 2. FT-IR spectra of (a) uncalcined and (b) calcined synthetic samples.

Table 1
Observed infrared band positions for uncalcined and calcined samples.

FTIR bands			
Functional Group	Wavenumber (cm ⁻¹) ^a	Wavenumber (cm ⁻¹) ^b	References
ν COOH (HAp)	(A) 3564 ^b	3570	[18–21]
ν_{as} N-H	(B) 3244 ^a	3250	[22]
ν N-H	(C) 3025 ^a	3020	[23]
ν_1, ν_2 NO ₂	(D) 1756 ^a	1756	[24]
δ O-H (H ₂ O)	(E) 1637 ^a	1637	[25]
ν_{as} CO ₃ ²⁻	(F) 1417 ^a	1417, 1415	[1, 19]
ν_2 NO ₂	(G) 1312 ^a	1314	[26]
ν_2 PO ₄ ³⁻	(H) 1088 ^b	1088, 1099	[19, 27]
ν_2 PO ₄ ³⁻	(I) 1019 ^b	1014	[19, 20]
ν_1 PO ₄ ³⁻	(J) 960 ^b	960, 978	[19, 20]
ν_2 NO ₂	(K) 827 ^a	831	[24]
ν O-H (H ₂ O)	(L) 630 ^b	632, 633	[19, 21]

^aThis work, ^bReported positions, a.- Uncalcined samples, b.- Calcined samples, ν - stretching, δ - bending.

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

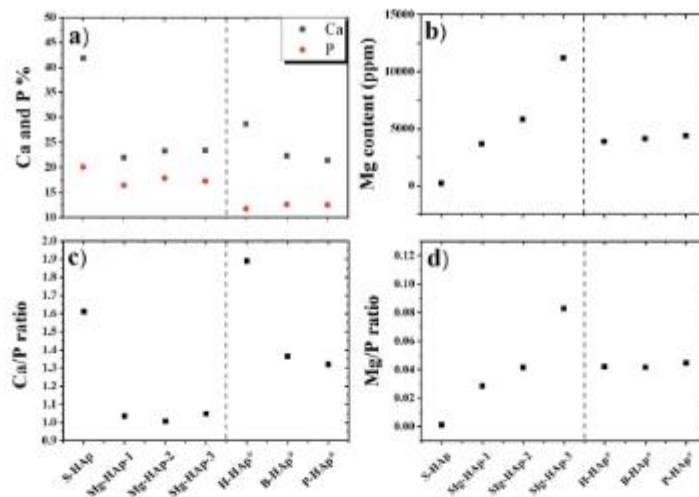


Fig. 3. (a) Ca and P percentage, (b) Mg content, (c) Ca/P ratio, and (d) Mg/P ratio of S-HAP, Mg-HAP-1, Mg-HAP-2, Mg-HAP-3. In all cases, the values for human (H-HAP*), bovine (B-HAP*), and porcine (P-HAP*) HAP reported by Londono-Restrepo et al. [3] are included. *Values reported by Ref. [3].

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

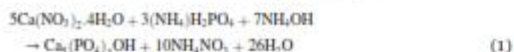
2. Materials and methods

2.1. Synthesis of hydroxyapatite

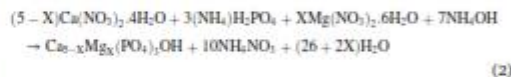
The wet chemical precipitation method was used to synthesize nano HAP following the methodology proposed by Sadat-Shojai et al. [1]. 0.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (99.1%, J.T. Baker, Mexico; code 0776-01) was reacted drop by drop with 1.0 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (99%, Sigma Aldrich, Japan; PCode 1002417039) and $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ACS grade, Golden bell, Mexico; code 26905) 0.032, 0.061, and 0.123 M, respectively to obtain Mg-HAP with Mg levels ranging from 4000 to 12000 ppm in accordance with values reported in the literature. The reaction was kept in stirring and heating at 37.5 °C, and the pH = 9 was controlled by adding NH_4OH (28.0–30.0%, J.T. Baker, USA; code 9721-02) and monitored using an OAKTON (1100 series) pH meter. At the end of the reaction, the product was left for aging treatment for 48 h. Then, the wet powder of Mg-HAP was filtered and dried at 95 °C for 1 h.

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

The reaction for the formation of synthetic HAP is:



The reaction for Mg-HAP formation is:



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

2.2. Functional groups analysis: FTIR analysis

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

2.3. Mineral composition analysis: ICP-OES

The mineral composition of the synthetic uncalcined samples was determined by Inductively Coupled Plasma with Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) using a Thermo Fischer Scientific ICAP 6000 Series equipment with an argon plasma. 0.1 g of each sample was digested with 7 mL of nitric acid (Baker 09.3%); the samples were analyzed in duplicate. Then, the samples were filtered (Whatman No. 42). And finally, the samples were exposed to the argon plasma to excite the elements in the samples to identify them through their characteristic emission.

2.4. Morphological analysis: HR-SEM

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

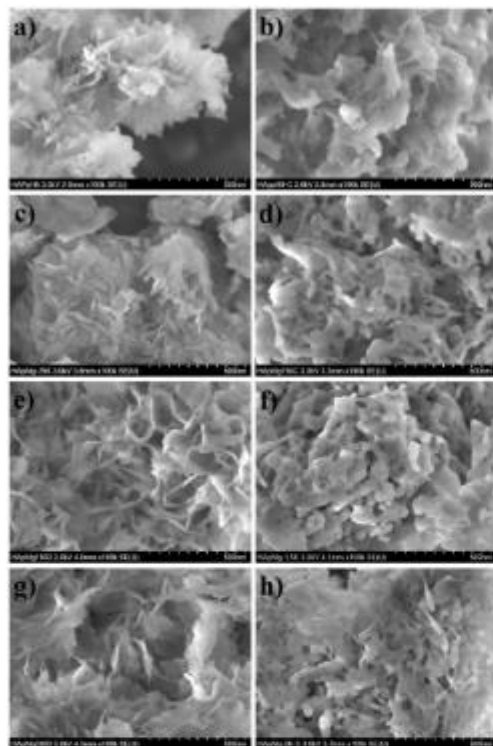


Fig. 4. SEM images of (a) S-HAp; (b) C-HAp; (c) Mg-HAp-1; (d) C-Mg-HAp-1; (e) Mg-HAp-2; (f) C-Mg-HAp-2; (g) Mg-HAp-3; (h) C-Mg-HAp-3.

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

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

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

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

2.6. Thermal analysis: DSC

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

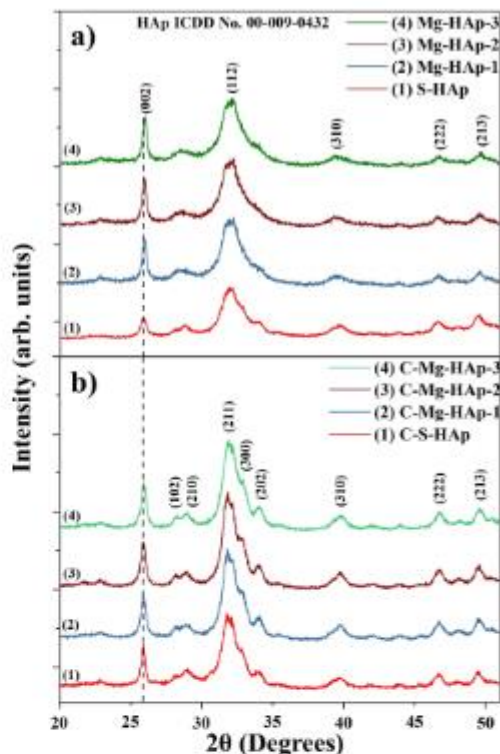


Fig. 5. X-ray diffraction patterns of (a) uncalcined; (b) calcined samples.

2.7. Raman spectroscopy

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

3. Results and discussion

3.1. Reaction by-products removal

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

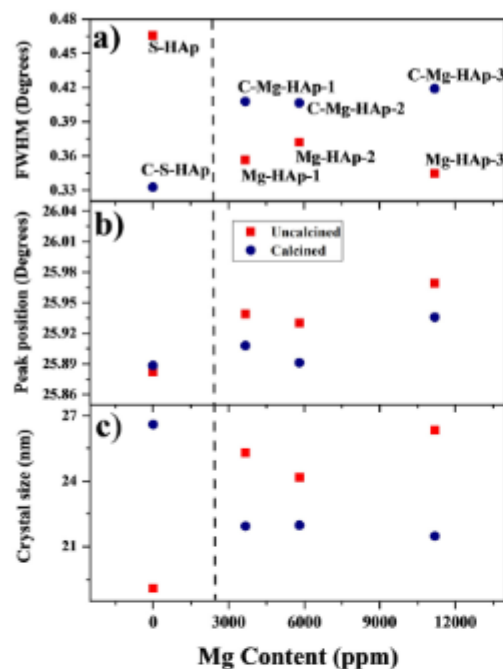


Fig. 6. (a) Changes in the FWHM of the (002) plane; (b) Changes in the peak position for (002) plane; (c) Changes in the crystal size for samples with different Mg concentrations.

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

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

Fig. 3c also displays the Ca/P ratio decreased after Mg adding as a consequence of its inclusion. Ca/P ratio for pure stoichiometric hydroxyapatite is 1.67, but 1.61 for S-HAp, which could be affected by the presence of the by-products reported in IR spectra. In the same way, Mg-HAp-1, Mg-HAp-2, and Mg-HAp-3 have even a lower Ca/P ratio than S-HAp because $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ produced additional by-products according to reaction (2). This fact is just a concentration effect that is improved after calcination. Fig. 3d shows the Mg/P ratio, and again, the linear trend confirms the inclusion of the Mg as expected. The Mg/P ratio

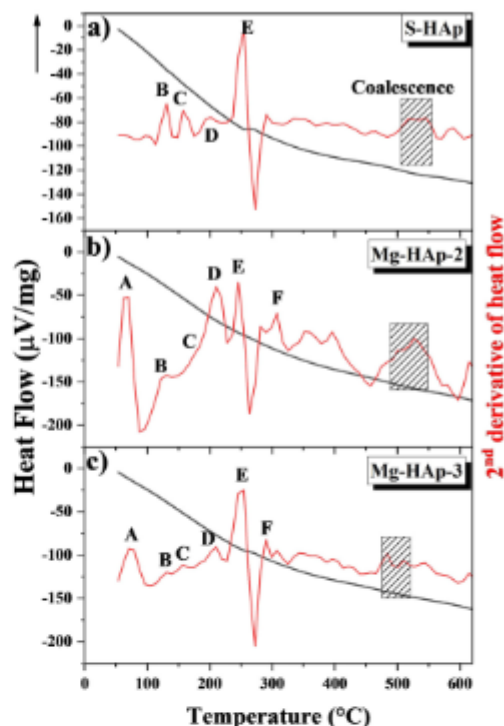


Fig. 7. DSC thermograms for (a) S-HAp; (b) Mg-HAp-2; (c) Mg-HAp-3.

exhibits an increase because of the increase in Mg concentration.

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

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

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

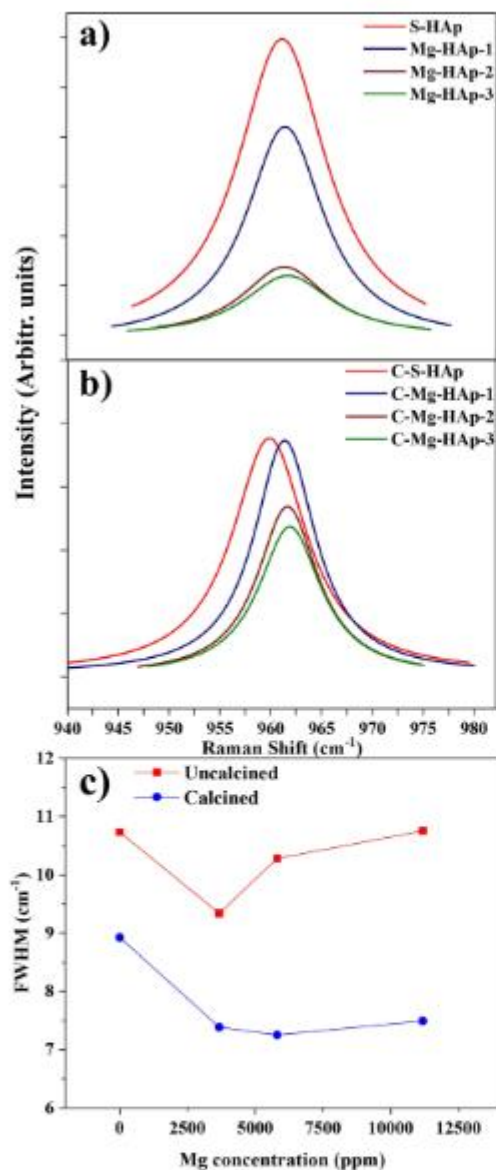


Fig. 8. Raman spectra for (a) uncalcined; (b) calcined synthetic samples; (c) FWHM of the Raman shift in 960 cm^{-1} .

3.4. Crystalline phase determining

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

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

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

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

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

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

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

3.6. Thermal events during calcination of Mg-added hydroxyapatites

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

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

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

3.7. Crystalline quality analysis by Raman spectroscopy

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

4. Conclusions

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

Declaration of competing interest

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

Acknowledgments

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

References

- [1] M. Sadat-Shiraji, M.T. Khorasani, E. Ditzgah-Khoshtargi, A. Jamshidi, *Acta Biomater.* 9 (2013) 7591–7621, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>.
- [2] S.L. Lee, Z.A.A. Hamid, *Ceram. Int.* 46 (2020) 17149–17175, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.04.103>.
- [3] S.M. Londoño-Restrepo, R. Jeronimo-Cruz, B.M. Millán-Malo, E.M. Evers-Munoz, M.E. Rodríguez-García, *Sci. Rep.* 9 (2019) 5915, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42269-5>.
- [4] S. Bose, G. Fielding, S. Tarabier, A. Bandyopadhyay, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 594–605, <https://doi.org/10.1016/j.tbiotech.2013.06.005>.
- [5] S.M. Londoño-Restrepo, R. Jeronimo-Cruz, E. Rubio-Rosas, M.E. Rodríguez-García, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 29 (52) (2018) 1–15, <https://doi.org/10.1007/s10856-018-0061-1>.
- [6] S.M. Londoño-Restrepo, C.F. Ramírez-Gutiérrez, A. del Real, E. Rubio-Rosas, M.E. Rodríguez-García, *J. Mater. Sci.* 51 (2016) 4431–4441, <https://doi.org/10.1007/s10853-016-0755-4>.
- [7] C.F. Ramírez-Gutiérrez, A.F. Pulecher-Ocampo, S.M. Londoño-Restrepo, B.M. Millán-Malo, M.E. Rodríguez-García, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 104 (2016) 339–344, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33401>.
- [8] C.F. Ramírez-Gutiérrez, S.M. Londoño-Restrepo, A. del Real, M.A. Mondragón, M.E. Rodríguez-García, *Ceram. Int.* 43 (2017) 7552–7559, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.03.046>.
- [9] A.M. Jamsa, M. Paunyn, E. Häberlein, A. Rakowska, T. Panz, *Microchim. Acta* 161 (2008) 349–353, <https://doi.org/10.1007/s00064-007-0864-2>.
- [10] F.J. Wolf, A. Cincinelli, *Med. Aspect. Med.* 24 (2003) 3–9, [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00087-5](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00087-5).
- [11] M.E. Bahrololoum, M. Javidi, S. Javadpour, J. Ma, J. Ceram. Process. Res. 10 (2009) 129–138.
- [12] J.A.M. Maier, D. Bernardini, Y. Kayatguter, A. Mazar, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Mol. Basis Dis.* 1689 (1) (2004) 6–12, <https://doi.org/10.1016/j.bmbd.2004.02.004>.
- [13] E. Landi, G. Logroscino, L. Proietti, A. Tampieri, M. Sandri, S. Sprito, J. Mater. Sci. Mater. Med. 19 (2008) 239–247, <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0032-5>.
- [14] S. Castiglioni, A. Cazzaniga, W. Albiavati, J.A.M. Maier, *Nutrients* 5 (2013) 3022–3033, <https://doi.org/10.3390/nu5083022>.
- [15] L.A. Martin, J. Mayer, *Nutr. Rev.* 57 (2009) 227–229, <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1999.tb0948.x>.
- [16] M. de la A. Aguilera-Barralón, K.F. Davison-Vázquez, C. Jiménez-Méndez, D. Jiménez-Mendoza, L.A. Olivares-Padrón, M.E. Rodríguez-García, *Nutr. Hosp.* 29 (2014) 1419–1426, <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.4.7382>.
- [17] T. Nagy-Kovacs, L. Stadnicka, A. Kincses, G. Spengler, M. Molnar, M. Tolner, I.E. Lukács, I.M. Sallaghy, G. Fekes, *Ceram. Int.* 44 (2018) 22979–22982, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.09.096>.
- [18] S.M. Londoño-Restrepo, B.M. Millán-Malo, A. del Real-López, M.E. Rodríguez-García, *Mater. Sci. Eng. C* 105 (2019) 110020, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110020>.
- [19] S.M. Londoño-Restrepo, L.F. Zubieta-Otero, R. Jeronimo-Cruz, M.A. Mondragón, M.E. Rodríguez-García, *J. Raman Spectrosc.* 50 (8) (2019) 1120–1129, <https://doi.org/10.1002/jrs.5854>.
- [20] A.A. Shalhout, M.A. Allam, M.A. Moharram, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 83 (2011) 56–60, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.07.036>.
- [21] M.H. Kobroglu, C. Orak, N. Bulut, O. Kaygılı, S. Kaser, T. Atan, *Ceram. Int.* 43 (2017) 15899–15904, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.08.164>.
- [22] S.S. Yang, Z.B. Chen, in: *Proceeding Eng., Elsevier Ltd*, 2018, pp. 906–910, <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.12.091>.
- [23] H. Kubota, C. Liu, T. Toyon, Z. Masuo, M. Ogura, N. Nakazawa, S. Inagaki, Y. Kubota, K.I. Shimizu, *ACS Catal.* 10 (2020) 2334–2344, <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b05151>.
- [24] H.B. Wu, M.N. Chan, C.K. Chan, *Aerosp. Sci. Technol.* 41 (2007) 581–588, <https://doi.org/10.1080/02786820701272036>.
- [25] S. Martínez, F. Acuña, F. Puente, *Mater. Construcción* 42 (1992) 25–36, <https://doi.org/10.3989/mc.1992.v42.i27.704>.
- [26] N. Vollmar, R. Ayers, *Int. J. Self-Propag. High-Temp. Synth.* 21 (2012) 189–201, <https://doi.org/10.3103/S1061386212040073>.

- [27] S. Tavakoli, M.R. Nikpour, A. Amari, M. Solari, S.M. Khatibi, S.M. Rezayati, P. Chen, M. Jahanshahi, *J. Nanoparticle Res.* 15 (2013) 1373, <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1373-8>.
- [28] M.E. Rodríguez, A. Gutiérrez, O. Zelaya-Angel, C. Vázquez, J. Giráldez, *J. Cryst. Growth* 235 (2001) 275–281, [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(01\)01550-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(01)01550-5).
- [29] S. Chavarresi, P.N. Dasu, *J. Energetic Mater.* 31 (2013) 1–20, <https://doi.org/10.1080/07370652.2011.575523>.
- [30] L.F. Lomatu, M.A. Pena-Rico, A. Heredia, J. Ocón-Piñero, A. Gómez-Carros, E. Velázquez, I.A. Belló, L. Barrio, *J. Mater. Sci.* 36 (2003) 4777–4782, <https://doi.org/10.1023/A:1027483220564>.
- [31] K. Gunawan, S. Freij, D. Zhang, F. Beach, M. Littlefair, *Chem. Eng. Sci.* 61 (2006) 5781–5790, <https://doi.org/10.1016/j.ces.2006.06.044>.
- [32] J. Mu, D.D. Perlmutter, *Thermochim. Acta* 56 (1982) 253–260, [https://doi.org/10.1016/0045-0031\(82\)87033-0](https://doi.org/10.1016/0045-0031(82)87033-0).
- [33] C. Eitner, A.K. Galwey, *Thermochim. Acta* 280 (1996) 203–219, [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(96\)03052-5](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(96)03052-5).

Segundo artículo publicado: Synthesis and characterization of bioinspired nano-hydroxyapatite by wet chemical precipitation



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

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

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

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

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

ARTICLE INFO

Keywords:
Hen eggshells
Trace minerals
Synthesis route
Morphology
Structural properties

ABSTRACT

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

1. Introduction

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

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

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

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

* Corresponding author.

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

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

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

Available online 16 August 2021

0272-8842/© 2021 Published by Elsevier Ltd.

Please cite this article as: Omar M. Gomez-Vazquez, *Ceramics International*, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.08.174>

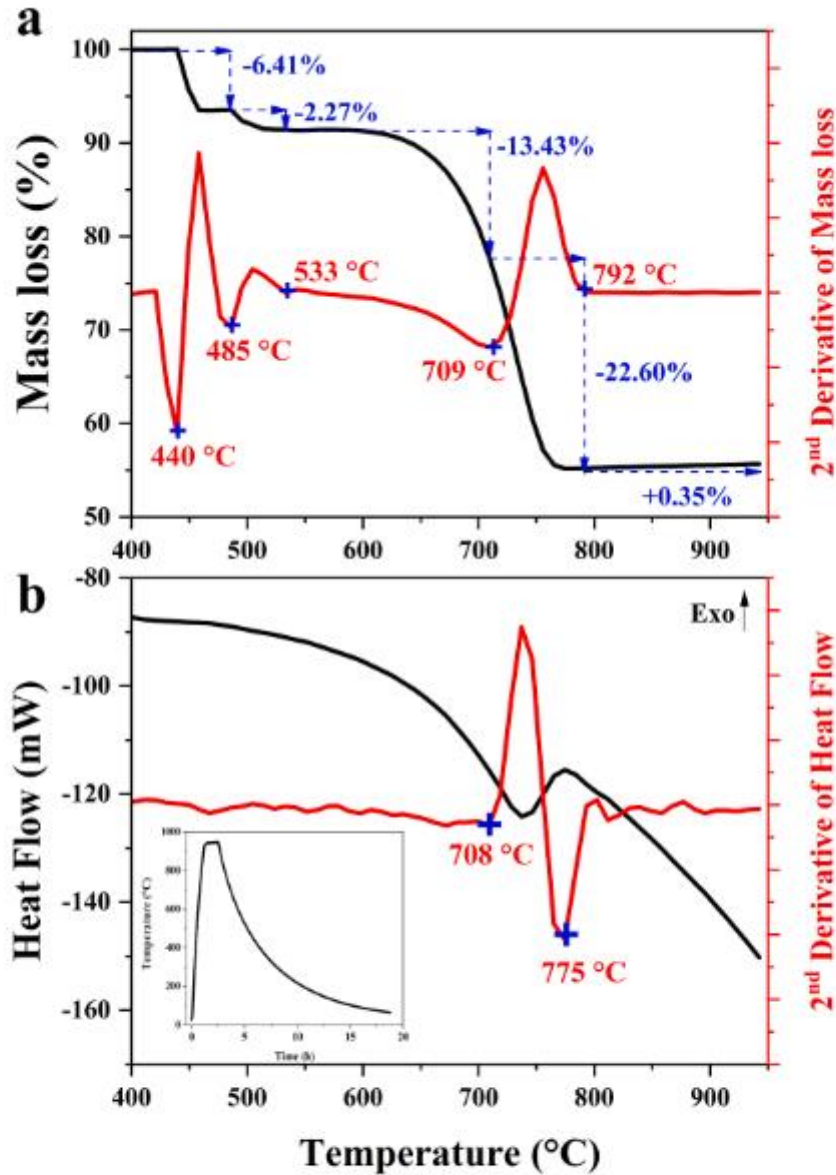


Fig. 1. (a) TGA curve for Raw-E and its second derivative. (b) DSC thermogram for Raw-E and its second derivative.

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

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

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

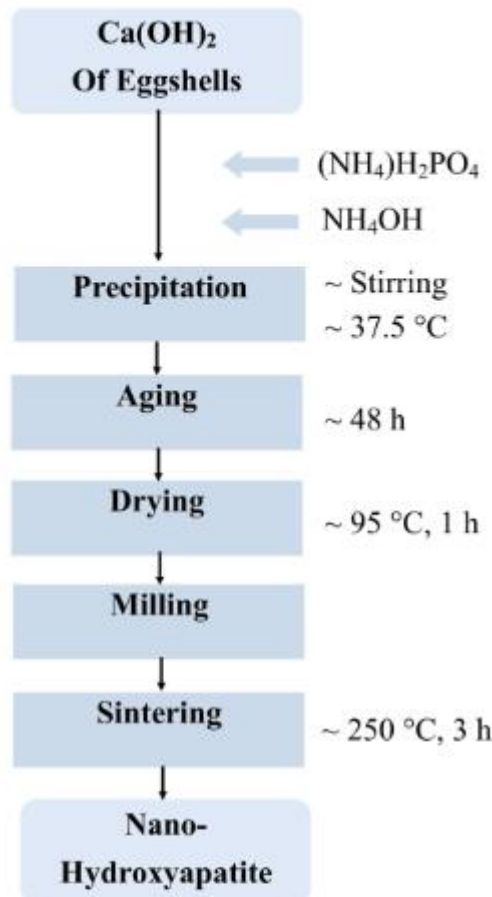


Fig. 2. Process diagram for synthesizing hydroxyapatite using eggshells.

2. Materials and methods

2.1. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ obtaining from eggshells

Hen eggshells from Bachoco-Company, Querétaro-México were boiled in distilled water to remove impurities and the protein membrane. Next, these eggshells were analyzed by Thermogravimetric analysis and differential scanning calorimetry. Based on the results, clean eggshells were calcined at 550 and 950 °C to obtain CaCO_3 and CaO , respectively. The calcined eggshell at 950 °C was soaked in distilled water for 2 months.

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

structure of the proteins; the third loss (553–709 °C; 13.43%) is related to carbohydrates degradation. Both protein and carbohydrates come from the eggshell membrane [15]. The last loss (709–792 °C; 22.60%) corresponds to the endothermal transition in which CO_2 releases from CaCO_3 (Fig. 1(b)). The slightly mass gain (0.35%) at the end of the TG curve is due to a CaO re-carbonation because of the CO_2 available in the air. Based on these findings, eggshells were calcined at 950 °C (see inset on Fig. 1(b)) under quasi-static conditions for 3 h. Samples were labeled as follows for their physicochemical characterization: eggshells calcined at 550 °C ($\text{CaCO}_3\text{-E}$), eggshells calcined at 950 °C (CaO-E), and CaO-E stirred in distilled water by 24 h ($\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-E}$). Commercial reagents from J.T. Baker were used as a control: calcium carbonate (99.9%; $\text{CaCO}_3\text{-C}$), calcium oxide (99.9%; CaO-C), and calcium hydroxide (96.4%; $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-C}$).

2.2. Hydroxyapatite synthesis by wet chemical precipitation method

Nanohydroxyapatite was obtained by the wet chemical precipitation method reported by Sadat-Shojai et al. [14]. 0.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (99.1%, J.T. Baker, Mexico; code 0776-01) was reacted with 1.0 M $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-E}$ drop by drop and assisted with stirring and heating at 37.5 °C. pH = 9 was controlled by adding NH_4OH (28.0–30.0%, J.T. Baker, USA; code 9721-02) and using a Hanna Instruments (HI2020) pH-meter. At the end of the reaction, it was aged 48 h. Then, the wet powder was filtered and dried at 94 °C for 1 h. Finally, the sample was pulverized, sieved (US mesh 100; 147 μm), and calcined at 250 °C for 3 h to remove reaction by-products. This sample was labeled as HAp-E, and one commercial hydroxyapatite from Sigma Aldrich (HAp-C) was used for comparative reasons. The process diagram is shown in Fig. 2.

2.3. Elemental composition by ICP-OES

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

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

Morphology of $\text{CaCO}_3\text{-E}$, CaO-E , $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-E}$, HAp-E, and HAp-C was studied with a Hitachi SU8230 scanning electron microscope (SEM). The samples were fixed on a copper holder with carbon tape, and the analysis conditions used 1 kV electron acceleration voltage at 12–20 Pa pressure. HAp-E and HAp-C were also analyzed by transmission electron microscopy (TEM) for a complimentary analysis of the morphology of the synthetic hydroxyapatites and their crystal size distribution. Measurements were carried out in a JEOL JEM-2200 FS. Both samples were dispersed in isopropanol using an ultrasonic homogenizer (UP200H; Hielscher) before the analysis. 2 μL each sample was put on a copper grid; the microscope was operated at 200 kV. Light-field images were taken and analyzed with the Digital Micrograph software (Gatan).

2.5. Particle size: dynamic light scattering (DLS)

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

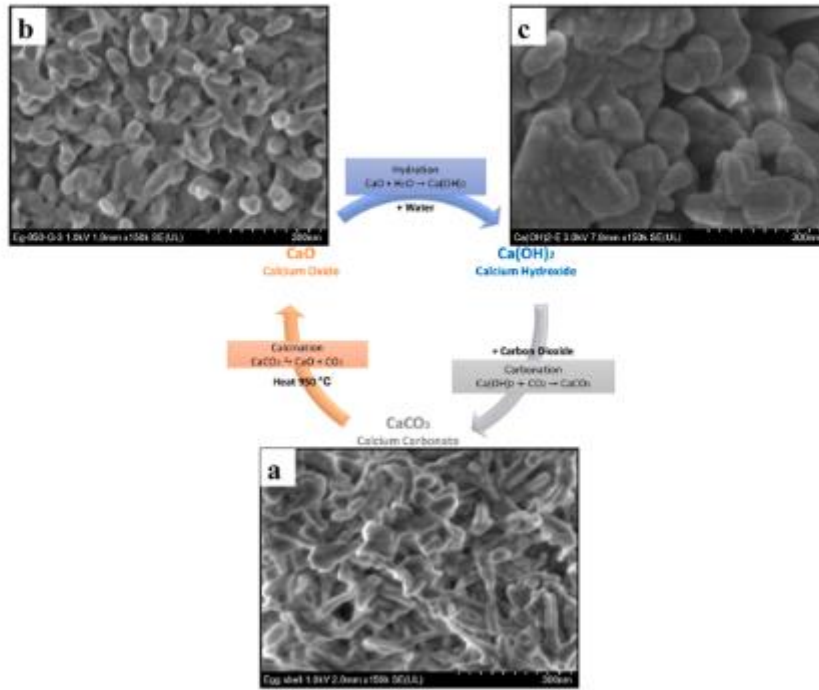


Fig. 3. Lime cycle for eggshells.

Table 1

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

Mineral (ppm)	Raw-E	CaCO3-E	HAp-H	HAp-B	HAp-P	HAp-E	HAp-C
Ca	428404	308639	285698	217222	216983	304417	423142
Mg	4436	3339	3887	4156	4184	3621	ND
P	1405	1707	107267	120648	161878	157998	125240
Na	990	1012	7912	4706	4345	312	ND
S	788	683	26	665	685	252	ND
Se	240	280	90	ND	154	127	ND
K	267	268	36	127	240	316	ND
Si	34	45	120	21	331	125	ND
Pw	17	22	89.2	ND	17	15	12
Al	17	20	37	ND	16	28	6
Zn	ND	29	179	83	182	124	4
Ba	28.63	34	NR	NR	NR	16	ND
Cu	ND	4	NR	NR	NR	12	ND
Mn	ND	ND	NR	NR	NR	1	ND
Ni	ND	ND	NR	NR	NR	39	ND
Ti	ND	ND	NR	NR	NR	19	ND
Pb	ND	ND	NR	NR	NR	1	ND
Ca/P	-	-	2.06	1.39	1.04	1.49	2.62

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

2.6. X-ray diffraction characterization

The powder X-ray diffraction patterns of commercial samples: CaCO_3 -C, CaO -C, Ca(OH)_2 -C, and HAp-C; the obtained precursors of eggshell: Raw-E (uncalcined eggshells), CaCO_3 -E, CaO -E, Ca(OH)_2 -E; and HAp-E were carried out with a Rigaku Ultima IV diffractometer operating at 40 kV, 30 mA with a CuK radiation wavelength of $\lambda =$

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

2.7. Functional groups: FT-IR analysis

Fourier transform infrared spectroscopy was used to study the

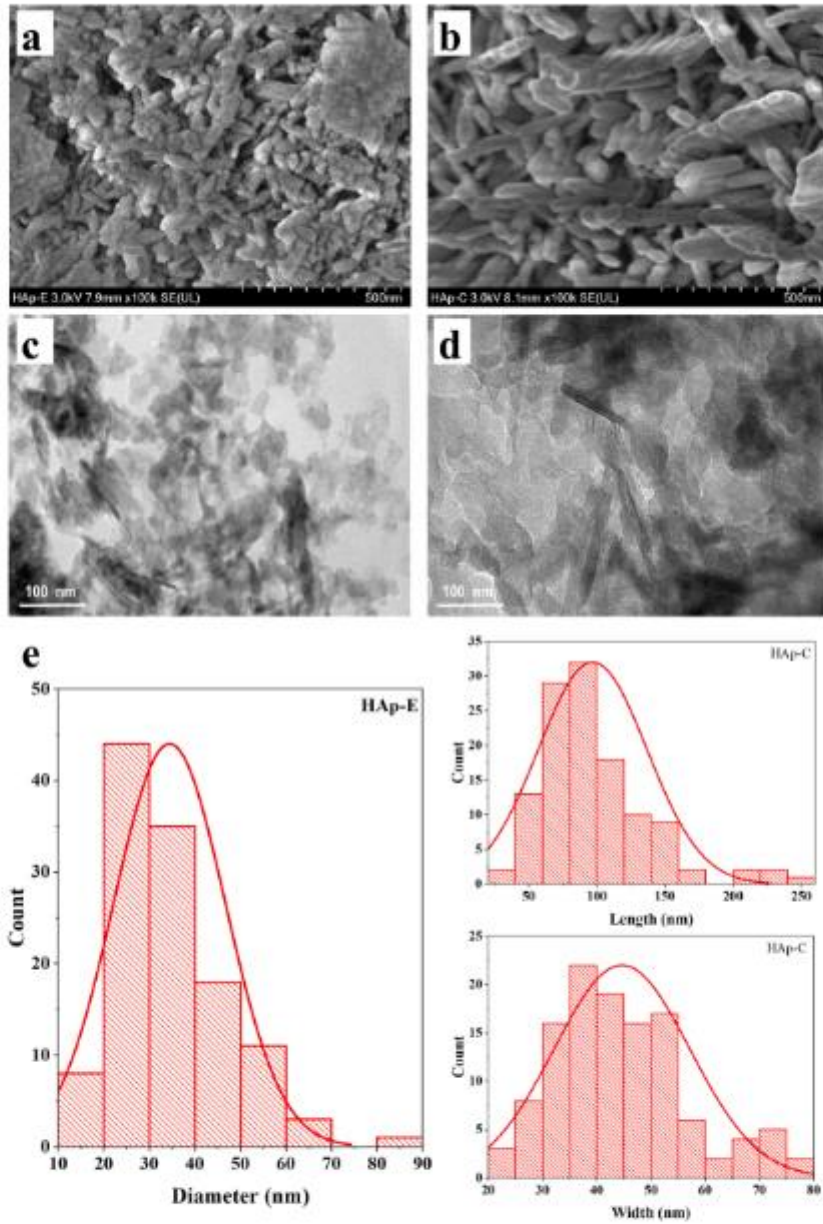


Fig. 4. HR-SEM images of (a) HAp-E and (b) HAp-C at 100000 \times . HR-TEM images of (c) HAp-E and (d) HAp-C at 100000 \times . (e) Crystal size distribution for HAp-E and HAp-C.

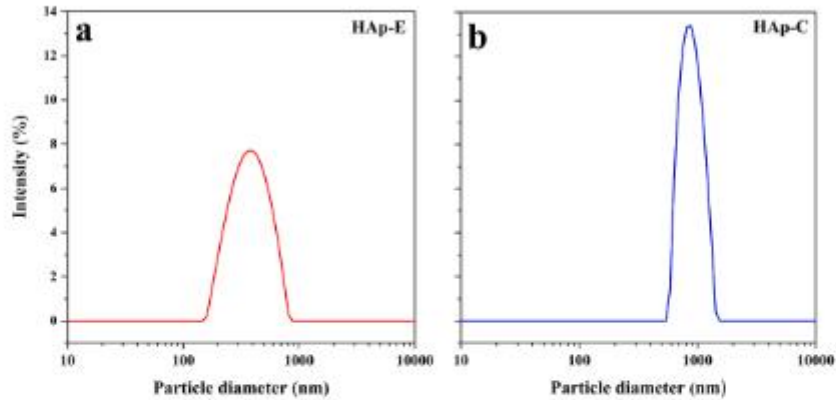


Fig. 5. Particle size distribution for (a) HAp-E and (b) HAp-C by DLS.

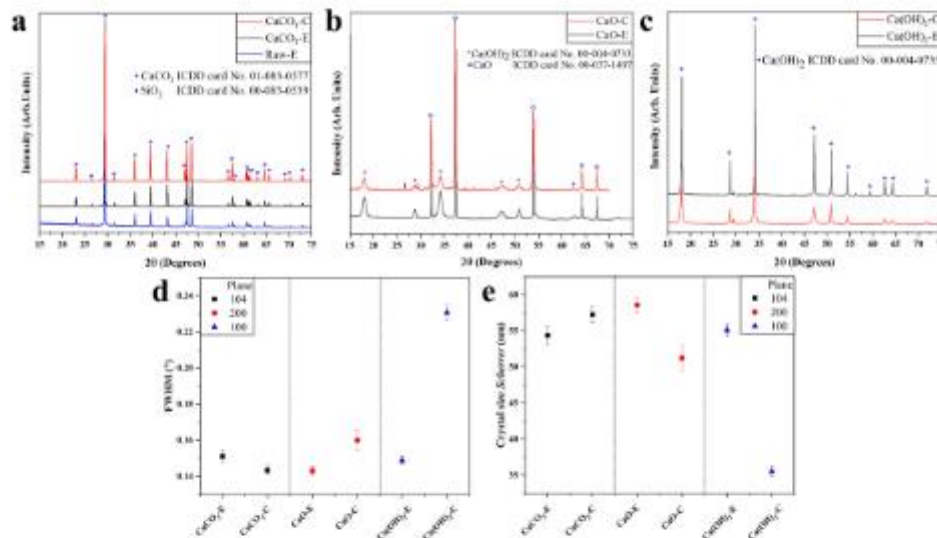


Fig. 6. X-ray diffraction patterns of (a) Raw-E, $\text{CaCO}_3\text{-E}$, and $\text{CaCO}_3\text{-C}$. (b) CaO-E and CaO-C . (c) $\text{Ca(OH)}_2\text{-E}$ and $\text{Ca(OH)}_2\text{-C}$. (d) FWHM of commercial and eggshells CaCO_3 , CaO , and Ca(OH)_2 . (e) Crystal size determination by the Scherrer's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

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

3. Results and discussion

3.1. Morphological analysis of the eggshells lime cycle

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

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



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



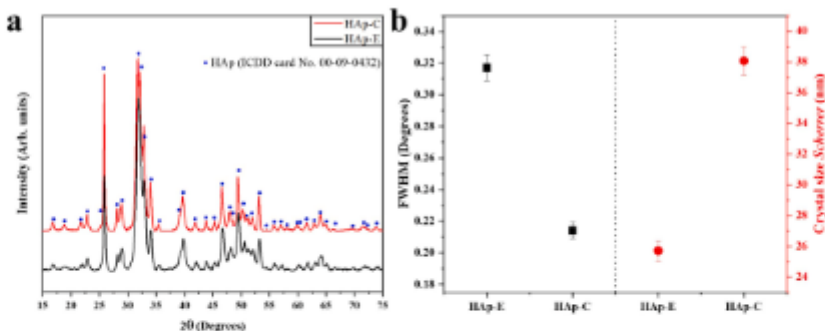


Fig. 7. X-ray diffraction patterns of (a) hydroxyapatite from eggshells (HAp-E) and hydroxyapatite of Sigma-Aldrich (HAp-C). (b) FWHM and crystal size by the Scherrer's equation.

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



Ca(OH)_2 purity depends on the high control during the lime cycle.

3.2. Mineral content

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

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

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

3.3. Morphological study of HAp

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

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

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

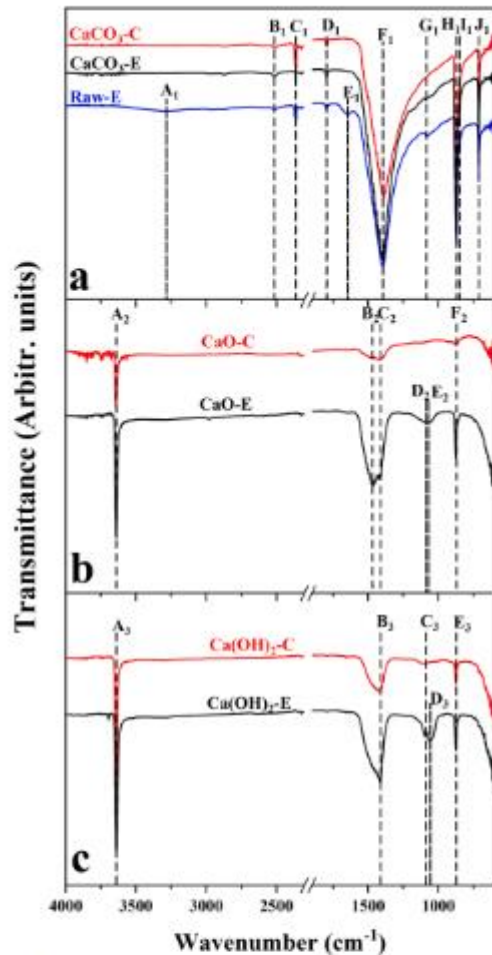


Fig. 8. Infrared spectra of eggshell and commercial samples of (a) CaCO_3 , (b) CaO , and (c) Ca(OH)_2 .

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

3.4. Particle size distribution: DLS

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

Fig. 3(a) shows that most of the particle size population of HAP-E is between 200 and 700 nm (0.2–0.7 μm) with maximum peaks around 382 nm (0.382 μm). This range is micrometric since crystals have formed cumuli of nanometric crystals (see Fig. 4) after aging. The largest

Table 2

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

FT-IR Spectroscopy			
Functional group	Wavenumber (cm^{-1}) ^a	Wavenumber (cm^{-1})	References
ν (O–H)	(A ₂) 3640	3643	[29]
	(A ₂) 3639	3620	[30]
	(A ₂) 3282	3288	[30,31]
ν (O–H)	(B ₁) 2513	2516	[32]
	(C ₁) 2361	2360	[31]
δ (C–O)	(D ₁) 1794	1799	[30–32]
		1796	[33]
		1795	[29]
C=O (Amides & Amines)	(E ₁) 1645	1652	[30,31]
		1645	[32]
ν (C–O)	(B ₂) 1465	1459	[33]
	(C ₂) 1411	1417	[30,30]
	(B ₂) 1412		
Amides & Amines	(F ₁) 1396	1385	[30,31]
	(G ₁) 1086	1083	[32]
ν_s (C–O)	(D ₂) 1088		
	(C ₂) 1091		
	(E ₂) 1054	1064	[34]
C–O	(D ₂) 1056		
ω (Ca–O)	(H ₁) 870	877, 875, 866	[29]
	(F ₂) 872	875	[30,31]
	(E ₂) 873	874	[33]
C–O	(I ₁) 847	863	[34]
	(J ₁) 711	713	[29,30, 33]
δ (C–O)		712	[31,32]

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

population for HAP-C is between 600 and 1250 nm (0.6–1.25 μm), with maximum peaks around 800 nm (0.80 μm) (Fig. 3(b)). This finding reinforces the idea that HAP-C was subjected to a calcination process at high temperature.

3.5. X-ray analysis for lime cycle

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

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

Fig. 6(d) shows the FWHM for the commercial sample and obtained from eggshells calcium carbonate, calcium oxide, and calcium hydroxide. CaCO_3 -E, CaCO_3 -C, CaO -E, CaO -C, and Ca(OH)_2 -E exhibit close FWHM values among them, while CaCO_3 -C has the highest one, which is associated with longer CaO -water reaction times. Cazalla et al. [38] showed that the crystal size of Ca(OH)_2 aged for 1, 4, and 14 years decreases as the aging time increases.

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

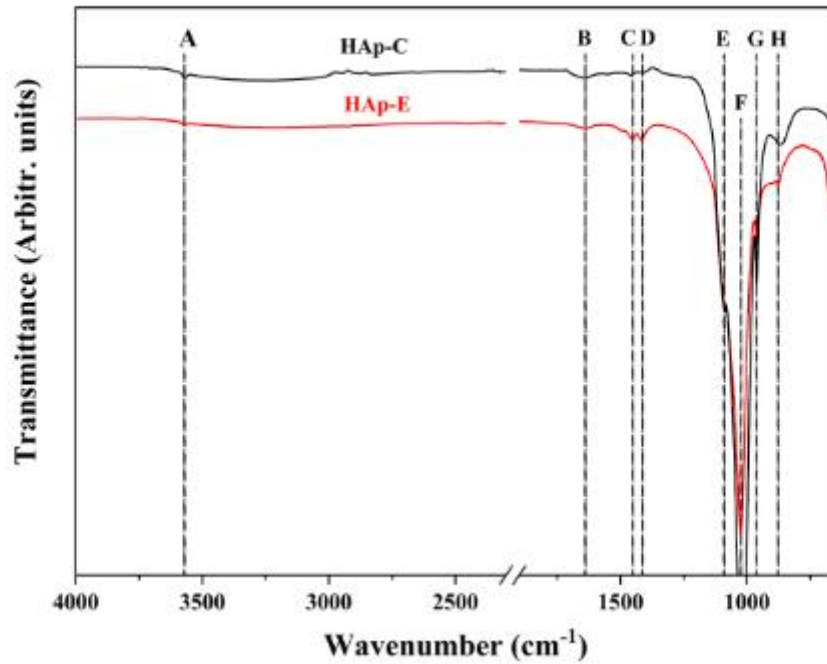


Fig. 9. Infrared spectra of HAp-E and HAp-C.

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

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

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

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

3.6. X-ray analysis for HAp

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

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

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

3.7. Vibrational analysis for the eggshells lime cycle

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

and carbohydrates from the raw eggshell membrane.

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

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

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

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

4. Conclusions

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

CRedit author contribution statement

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

Declaration of competing interest

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

Acknowledgments

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

References

- [1] E. O'Neill, G. Awala, L. Daneshmandi, O. Umesh, K.W.H. Lo, The role of ions on bone regeneration, *Drug Discov. Today* 23 (4) (2018) 879–890, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.049>.
- [2] S.M. Londono-Restrepo, R. Jeronimo-Cruz, B.M. Millán-Malo, E.M. Rivera-Manzo, M.E. Rodriguez-Garcia, Effect of the nano crystal size on the X-ray diffraction patterns of biogenic hydroxyapatite from human, bovine, and porcine bones, *Sci. Rep.* 9 (1) (2019) 1–12, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42269-9>.
- [3] S.M. Londono-Restrepo, R. Jeronimo-Cruz, E. Kufin-Rosas, M.E. Rodriguez-Garcia, The effect of cyclic heat treatment on the physicochemical properties of bio hydroxyapatite from bovine bone, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 29 (5) (2018) 52, <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6051-5>.
- [4] N.A.M. Barakat, M.S. Khe, A.M. Omran, F.A. Shekik, H.Y. Kim, Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods, *J. Mater. Process. Technol.* 209 (7) (2009) 3408–3415, <https://doi.org/10.1016/j.jmatpro.2009.07.040>.
- [5] C.F. Ramirez-Gutierrez, A.P. Palechor-Ocampo, S.M. Londono-Restrepo, B. M. Millán-Malo, M.E. Rodriguez-Garcia, Cooling rate effect on thermal, structural, and microstructural properties of bio-hydroxyapatite obtained from bovine bone, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 104 (2) (2016) 339–344, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33491>.
- [6] A.M. Jambu, M. Faryna, K. Haberko, A. Rakowika, T. Pans, Chemical and microstructural characterization of natural hydroxyapatite derived from pig bones, *Microchim. Acta* 161 (3) (2008) 349–353, <https://doi.org/10.1007/s00664-007-0864-2>.
- [7] K. Haberko, M.M. Bucha, W. Muszawa, A. Pyda, J. Brzeznińska-Miecznik, J. Carpentier, Behaviour of bone origin hydroxyapatite at elevated temperatures and in O_2 and CO_2 atmospheres, *Ceram. Int.* 35 (6) (2009) 2537–2540, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2009.02.006>.
- [8] S.M. Londono-Restrepo, B.M. Millán-Malo, A. del Real-López, M.E. Rodriguez-Garcia, In situ study of hydroxyapatite from cattle during a controlled calcination process using HT-XRD, *Mater. Sci. Eng. C* 105 (2019) 110020, <https://doi.org/10.1016/j.msc.2019.110020>.
- [9] S.C. Wu, H.C. Hsu, S.K. Hsu, Y.C. Chang, W.F. Ho, Synthesis of hydroxyapatite from eggshell powders through ball milling and heat treatment, *J. Asian Ceram. Soc.* 4 (1) (2016) 85–90, <https://doi.org/10.1016/j.jascer.2015.12.002>.
- [10] E.M. Rivera, M. Ariza, W. Brunow, V.M. Castano, J.B. Diaz-Estrada, E. Hernandez, J.R. Rodriguez, Synthesis of hydroxyapatite from eggshells, *Mater. Lett.* 41 (3) (1999) 128–134, [https://doi.org/10.1016/S0167-5776\(99\)00118-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5776(99)00118-4).
- [11] S.S.A. Abidi, Q. Muraza, Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction, *J. Mater. Sci. Technol.* 30 (4) (2014) 307–310, <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2013.10.011>.
- [12] F. Wang, C. Li, H. Gong, H. Wang, J. Liu, Morphology control and growth mechanism of magnesium hydroxide nanoparticles via a simple wet precipitation method, *Ceram. Int.* 37 (8) (2011) 3565–3570, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.05.156>.
- [13] G. Gergely, F. Wéber, I. Lukács, A.L. Yöri, Z.E. Horváth, J. Mihály, C. Balazs, Preparation and characterization of hydroxyapatite from eggshell, *Ceram. Int.* 36 (2) (2010) 803–806, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2009.09.020>.
- [14] M. Sadaq-Shojai, M.T. Khorrami, E. Dirpanah-Khoshtargi, A. Jamshidi, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomater.* 9 (8) (2013) 7591–7621, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>.
- [15] Y. Daughin, J.P. Cail, M. Salomé, J. Sauter, C.T. Williams, Microstructure and chemical composition of giant avian eggshells, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (6) (2006) 1761–1771, <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0784-8>.
- [16] M. Galván-Ruiz, K. Velázquez-Castillo, M.A. Pérez-Lara, J.L. Arjona, L. Basso, M. E. Rodriguez-Garcia, Chemical and physical characterization of stucco from a

- mexican colonial building: el Museo del Calendario de Queretaro, *Archaeometry* 51 (3) (2009) 701–714, <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2008.00456.x>.
- [17] H.K. Kim, H.S. Han, K.S. Lee, D.H. Lee, J.W. Lee, H. Jeon, S.Y. Cho, H.J. Koh, Y. C. Kim, H.K. Seok, Comprehensive study on the roles of released ions from biodegradable Mg-5 wt% Ca-1 wt% Zn alloy in bone regeneration, *J. Tissue Eng. Regen. Med* 11 (2017) 2710–2724, <https://doi.org/10.1002/term.2146>.
- [18] K.K. Kula, F.R. Singer, H.E. Gruber, Skeletal and hormonal effects of magnesium deficiency, *J. Am. Coll. Nutr.* 28 (2009) 131–141, <https://doi.org/10.1080/07335724.2008.10718764>.
- [19] R.P. Heaney, Role of dietary sodium in osteoporosis, *J. Am. Coll. Nutr.* 25 (2006), <https://doi.org/10.1080/07335724.2006.10719577>, 271S–276S.
- [20] F. Yang, D. Yang, J. Tu, Q. Zheng, L. Cai, L. Wang, Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and *in vivo* bone formation by activating Wnt/catenin signaling, *Stem Cell* 29 (2011) 981–991, <https://doi.org/10.1002/stem.546>.
- [21] J. Bejarano, R. Detsch, A.R. Boccacini, H. Falza, PLLA scaffolds with Cu- and Zn-doped bioactive glasses having multifunctional properties for bone regeneration, 2016, pp. 1–11, <https://doi.org/10.1002/9781119359532>.
- [22] C.T. Champa, A.C. Linsidou, Zinc and human health: an update, 2012, pp. 321–334, <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7579-1>.
- [23] ASTM F1088–04a, Standard Specification for Beta-Tricalcium Phosphate for Surgical Implants, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2010, <https://doi.org/10.1533/9780804448110>.
- [24] M.D.L.A. Aguilera-Barcelo, J.A. Rivera-Márquez, H.M. Trujillo-Arriaga, J. A. Tamayo y Orozco, E. Barrios-Mercado, M.E. Rodríguez-García, Intake of dehydrated nopal (*Opuntia ficus indica*) improves bone mineral density and calcitriol in adult Mexican women, *Food Nutr. Res.* 57 (1) (2013) 19106, <https://doi.org/10.3402/fnr.v57i10.19106>.
- [25] D.I. Goksharapov, V.M. Kashkarov, N.A. Rumyantseva, P.V. Sorokin, A.S. Leshchik, E.I. Agapov, E.P. Demashchikaya, Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by precipitation using hen's eggshell, *Ceram. Int.* 39 (4) (2013) 4539–4549, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.11.050>.
- [26] S.D. Lala, E. Renu, P. Deb, A.S. Deoghan, Physico-chemical and biological behaviour of eggshell bio-waste derived nano-hydroxyapatite matured at different aging time, *Mater. Today Commun* 27 (2021) 102443, <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102443>.
- [27] W. Luo, Y. Huang, X. Zhou, Q. Han, X. Peng, B. Ren, J. Li, M. Li, L. Cheng, The effect of disaggregated nano-hydroxyapatite on oral biofilm *in vitro*, *Dent. Mater* 36 (7) (2020) e207–e216, <https://doi.org/10.1016/j.dental.2020.04.005>.
- [28] O. Cazalla, C. Rodríguez-Navarro, E. Sebastián, G. Calzavara, M.J. Torre, Aging of lime putty: effects on traditional lime mortar carbonation, *J. Am. Ceram. Soc.* 83 (5) (2004) 1070–1076, <https://doi.org/10.1111/j.1131-2916.2004.001332.x>.
- [29] M. Gahrán-Ruiz, J. Hernández, L. Baines, J. Noriega-Molina, M.E. Rodríguez-García, Characterization of calcium carbonate, calcium oxide, and calcium hydroxide as starting point in the improvement of lime for their use in construction, *J. Mater. Civ. Eng.* 21 (11) (2009) 694–698, [https://doi.org/10.1061/\(asce\)0898-1561\(2009\)21:11\(694\)](https://doi.org/10.1061/(asce)0898-1561(2009)21:11(694)).
- [30] J. Carvalho, J. Araújo, F. Castro, Alternative low-cost adsorbent for water and wastewater decoloration derived from eggshell waste: an overview, *Water Biomass Valorization* 2 (2) (2011) 157–167, <https://doi.org/10.1007/s12049-010-9029-y>.
- [31] W.T. Tsai, J.M. Yang, C.W. Lai, Y.H. Chang, C.C. Lin, C.W. Yeh, Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membranes, *Bioresour. Technol.* 97 (3) (2006) 488–493, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.030>.
- [32] M.S. Tiao, L.A.V. Bianco, A.C.Q. Cagas, B.R.B. Dele Cruz, J.C. Encay, J.V. Genting, E.O. Arzoo, V.I.P. Mahayo, Efficiency of calcium carbonate from eggshells as an adsorbent for cadmium removal in aqueous solution, *Sustain. Environ. Res.* 28 (6) (2018) 326–332, <https://doi.org/10.1016/j.serj.2018.09.002>.
- [33] U. Anjuresulu, S. Sankumar, Bioactive nanocrystalline zeolite-like synthesized by sol-gel combustion method by using eggshell waste as calcium source, *Bull. Mater. Sci.* 37 (2) (2014) 207–212, <https://doi.org/10.1007/s12034-014-0646-3>.
- [34] I. Habis, N. Sholewa, D. Mula, T. Thonappalli, E. Chikala, J. Aho, Synthesis of nano-calcium oxide from waste eggshell by sol-gel method, *Sustainability* 11 (11) (2019) 3196, <https://doi.org/10.3390/su11113196>.
- [35] S.M. Londoño-Restrepo, L.F. Zabala-Otero, H. Jaramillo-Cruz, M.A. Mondragon, M.E. Rodríguez-García, Effect of the crystal size on the infrared and Raman spectra of bio-hydroxyapatite of human, bovine, and porcine bones, *J. Raman Spectrosc.* 39 (8) (2019) 1–10, <https://doi.org/10.1002/jrs.5814>.
- [36] L.F. Zabala-Otero, S.M. Londoño-Restrepo, G. Lopez-Chavez, E. Hernández-Bocora, M.E. Rodríguez-García, Comparative study of physicochemical properties of bio-hydroxyapatite with commercial samples, *Mater. Chem. Phys.* 259 (2021) 124201, <https://doi.org/10.1016/j.mchemphys.2020.124201>.
- [37] N.A.S. Mohd Farid, J. Alipal, H.Z. Abdulrah, M.I. Sahr, T.C. Lee, Synthesis of eggshell derived hydroxyapatite via chemical precipitation and calcination method, *Mater. Today Proc.* 42 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.11.279>.