



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN INGENIERÍA Y CIENCIA APLICADAS**

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE BIOCERÁMICOS CON BASE
A HIDROXIAPATITA”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORADO EN INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS CON OPCIÓN
TERMINAL EN TECNOLOGÍA DE MATERIALES**

IVETTE MENDOZA TORRES

ASESOR: DRA. MARINA VLASOVA

CO-ASESOR: DR. IVÁN MARTÍNEZ DUNCKER RAMÍREZ

SINODALES:

DR. PEDRO ANTONIO MÁRQUEZ AGUILAR

DR. JOSÉ GONZALO GÓNZALEZ RODRÍGUEZ

DR. MYKOLA KAKAZYEY

DR. ISAÍ ROSALES CADENA

DR. RENÉ GUARDIÁN TAPIA

RESUMEN

En el presente trabajo se hizo una investigación acerca de los procesos que influyen en la síntesis, procesamiento y aplicación del mineral hidroxapatita el cual es el principal componente de huesos y dientes y es ampliamente utilizado en la industria de los biomateriales para implantes y recubrimientos de estos, gracias a sus propiedades de compatibilidad con el cuerpo humano. Los parámetros que se fueron hallados aptos para este experimento son con el cambio de pH (8, 9 y 11) y el cambio de temperatura (800, 1000, 1200°C) respectivamente; encontrando los resultados óptimos de cristalinidad, pureza y crecimiento celular a pH= 9-11 con temperatura de síntesis 1000 – 1200°C. Los resultados obtenidos fueron cuantificados por distintos métodos (DRX, IR, SEM, MTT).

La mecano-síntesis y la mecanoactivación de la hidroxapatita en tambores de acero se acompaña de la contaminación de la hidroxapatita por medio de los residuos del desgaste ejercido en el procesamiento (Hierro + Manganeso). Una gran parte del hierro oxidado forma inclusiones superparamagnéticas distribuidas en el polvo de HA. Una pequeña parte de los iones Fe^{3+} y Mn^{2+} de los productos de desgaste del acero entra en la red de hidroxapatita sustituyendo los iones Ca^{2+} . Como resultado, se forma un polvo de nanocompuestos que consiste de hidroxapatita aleado por iones Fe^{3+} y Mn^{2+} e inclusiones de ferrita. La composición de fases de los polvos de HA, el grado de su aleación por los iones Fe^{3+} y Mn^{2+} , y el contenido de las inclusiones de ferrita se pueden controlar cambiando el tiempo de mecanizado.

ABSTRACT

In the present work an investigation was made about the processes that influence the synthesis, processing and application of the mineral hydroxyapatite which is the main component of bones and teeth and is widely used in the biomaterial industry for implants and coatings of these, thanks to its compatibility properties with the human body. The parameters that were found suitable for this experiment are with the change of pH (8, 9, and 11) and the change of temperature (800, 1000, 1200°C) respectively; finding the optimal results of crystallinity, purity and cell growth at pH= 9-11 with synthesis temperature 1000 – 1200°C. the results obtained were quantified by different methods (DRX, IR, SEM, MTT).

The mechanosynthesis and mechanotreatment of hydroxyapatite in steel drums with steel balls is accompanied by the contamination of hydroxyapatite by their wear debris (iron + manganese). A large part of oxidized iron forms superparamagnetic inclusions distributed in HA powder. A small part of Fe³⁺ and Mn²⁺ ions from the steel wear debris enters into the hydroxyapatite lattice, substituting Ca²⁺ ions. As a result, a nanocomposite powder consisting of hydroxyapatite, alloyed by Fe³⁺ and Mn²⁺ ions and ferrite inclusions forms. The phase composition of HA powders, the degree of their alloying by Fe³⁺ and Mn²⁺ ions, and the content of ferrite inclusions can be controlled by changing the time of mechanotreatment.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios el creador de todo, al que por su gracia y misericordia me ha permitido concluir con éxito esta etapa tan importante en mi profesión pues sin él nada de esto sería posible.

A mi familia, mi esposo Joaquin Cabello Gómez por tu apoyo incondicional, tu paciencia y amor , a mi hijo Erick Jesus Cabello Mendoza por ser el motor que me impulsa cada día a ser mejor en todo lo que hago, los amo infinitamente, a mi madre por tu apoyo y amor, te amo mucho mami.

Agradezco al Centro de Investigación en Ingeniería y Ciencias Aplicadas por brindarme la oportunidad de continuar con mi preparación académica.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo Económico brindado durante el desarrollo del proyecto en mis estudios de posgrado.

A la Dra. Marina Vlasova pues siempre ha sido un gran ejemplo para mí de perseverancia, por su apoyo académico y personal, por tanta enseñanza muchísimas gracias.

Al Dr. Pedro Antonio Márquez Aguilar por siempre estar al pendiente del proyecto, por la confianza que deposito en mí todos estos años, por todas sus enseñanzas y consejos, muchas gracias.

Al Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez, por su apoyo y confianza permitiéndome trabajar en su laboratorio de glicobiología, gracias.

Al Dr. Mykola Kakazyey por sus enseñanzas e interés en el proyecto muchas gracias.

Al Dr. Isaí Rosales Cadena pues siempre estuvo atento a mi proyecto ayudándome en los tutoriales aportando importantes correcciones, muchas gracias.

Al Dr. José Gonzalo González Rodríguez y Dr. Rene Guardián Tapia por aceptar participar en este proyecto, muchas gracias.

A mis amigas pues son parte fundamental en mi vida, por todo el apoyo muchas gracias, Abigail, Norma Verónica.

DEDICATORIAS

*Pues las montañas podrán moverse
y las colinas desaparecer,
pero aun así mi fiel amor por ti permanecerá;
mi pacto de bendición nunca será roto
—dice el SEÑOR, que tiene misericordia de ti—.*

Isaías 54:10

ÍNDICE

RESUMEN
ABSTRACT
AGRADECIMIENTOS
DEDICATORIAS
INTRODUCCIÓN
OBJETIVO GENERAL.....
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....
CAPITULO I. REVISIÓN LITERARIA.....
I.1. Bioceramicas y fosfatos de calcio
I.2. Biomateriales.....
I.3. Ventajas y desventajas de la cerámica
I.4. Implantes cerámicos y la estructura del hueso
I.5. Hidroxiapatita.....
CAPITULO II. METODOS DE INVESTIGACIÓN DE COMPONENTES INICIALES E HIDROXIAPATITA SINTETIZADA
II.1. Método de difracción de rayos X.....
II.2. . Método de Infra-rojo.....
II.3. Método de microscopia de barrido electrónico

II.4. Método de resonancia paramagnética (EPR).....

II.5. Método de viabilidad celular

CAPITULO III. MÉTODO DE PREPARACIÓN DE HIDROXIAPATITA.....

III. 1. Síntesis de hidroxiapatita por el método de deposición de químico.....

III.2. Granulación de polvos de hidroxiapatita

III.2.1. Método de preparación

III.2.2. Parámetros del proceso de granulación

III.3. Pruebas in – vitro para muestras de HA obtenida por el método de deposición química

III.3.1. Descripción del método MTT

III.3.2. Características de las células de trabajo SAOS – 2 (ATCC HTB-85)

III.3.3. Expresión del antígeno

III.3.4. Medio de Crecimiento Completo

III.3.5. Subcultivo.....

III.3.6. Crioconservación.....

III.3.7. Condiciones de cultivo

III.3.8. Cultivo de células

III.3.9. Preparación de los reactivos

III.3.10. Protocolo del ensayo MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio)

III.3.11. resultados de pruebas in vitro

CAPITULO IV. PREPARACIÓN DE HIDROXIAPATITA POR EL MÉTODO DE MECANOSÍNTESIS.....

IV.1. Mecanosíntesis de hidroxiapatita dopada con iones de hierro

IV.2. Investigación de las propiedades de hidroxiapatita.....

IV.2.1. Resultados por el método de difracción de rayos X.....

IV.2.2. Resultados por el método de resonancia paramagnética (EPR)

IV.2.3. Resultados por el método de microscopia de barrido electrónico.....

IV.3. Mecanoactivación de hidroxiapatita.....

IV.3.1. Resultados por el método de difracción de rayos X.....

IV.3.2. Resultados por el método de resonancia paramagnética (EPR).....

CAPITULO V. CONCLUSIONES.....

REFERENCIAS

ANEXOS

LISTA DE TABLAS

Tabla I.1. Características significativas de algunos biomateriales.

Tabla I.2. Comparación general de materiales para implantes

Tabla 1.3. Propiedades mecánicas de tejido esquelético.

Tabla I.4. Composición comparativa y propiedades cristalográficas y mecánicas del esmalte humano, hueso y cerámica de HA.

Tabla III.1. Composición de las muestras para los ensayos de viabilidad celular.

Tabla IV.1. Los valores de g-factores de las señales de resonancia en los polvos sintetizados y recocidos.

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1. Reactividad relativa de las diferentes clases de biocerámica. TCP es fosfato tricálcico.

Figura I.2. Ilustración de los usos clínicos de la cabeza a los pies para la biocerámica.

Figura I.3. Sección longitudinal que muestra la estructura del hueso largo.

Fig. 1.4. Módulo de Young (E) para varios implantes en comparación con el hueso.

Figura III.1. Esquema común de preparación de hidroxiapatita.

Figura III. 2. Fragmentos de los patrones de difracción de rayos X de polvos obtenidos a partir de soluciones con diferentes pH; (a) pH=8; (b) pH=9; (c) pH=11 y después del

Figura III. 3. Fragmentos de los patrones de difracción de rayos X de polvos obtenidos a partir de soluciones con pH = 8 (a) y los picos de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, con (002) (b) y (211) (c).

Figura III. 4. Cambio de la intensidad del pico de difracción (a), el tamaño cristalitas (b) y la distancia interplanar (c, d) en polvo $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ en función del pH inicial de la solución madre. En (a, b, c) por (002); (D) de (211).

Figura III.5. Cambio de la intensidad de los picos de difracción (a, b), el espaciado interplanar (c) y el tamaño RDC (d) de los polvos calcinados a 800°C , dependiendo del pH inicial de la solución inicial. En (a, c, d) por (002) de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, (b) para (211) de $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Figura III. 6. Cambio de la intensidad del pico de difracción (002) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (a) y el tamaño de RDC (b) en forma de polvo, se calcinó a 1000°C , dependiendo del pH inicial de la solución madre.

Figura III.7. Cambio de la intensidad del pico de difracción (a) y el tamaño de la República de China (b) dependiendo de la temperatura de los polvos de tratamiento. En (a):

(1) el pico de (002) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, (2) pico (211) $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. El valor de la solución madre inicial $\text{pH} = 8$.

Figura III.8. La relación de las intensidades de pico en función de tiempo de tratamiento térmico 1000°C . I_1 es la intensidad de la línea (002) de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. I_2 es la intensidad de la línea (211) de $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. $T_{\text{tr.}} = 1000^\circ\text{C}$. $\text{pH} = 8$.

Figura III.9. Imagen de infrarojo de la muestra obtenida resultado del método de precipitación con $\text{pH} = 9$. (a, a') inicial; (b, b') después de tratamiento térmico a 1000°C durante 2 horas.

Figura III.10. Imagen de SEM de los agregados de hidroxiapatita obtenidos por el método de precipitación (a) y el contenido de los elementos en los agregados (b).

Figura III.6. Efecto de la velocidad del impulsor en el proceso de granulación.

Figura III.7. Imagen de SEM de hidroxiapatita granulada con $\text{pH}=9$ (a,b,c) y contenido de elementos en los granulos (d,e).

Figura III.8. Estructuras de MTT y producto de formazano coloreado

Figura III.9. Placa de 96 pocillos, indicando las pastillas de hidroxiapatita con diferentes parámetros de temperatura.

Figura III.10. Resultados estadísticos del ensayo MTT para muestras de HA con $\text{pH}=8$ con diferentes temperaturas de sinterización.

Figura III.10. Resultados estadísticos del ensayo MTT para muestras de HA con $\text{pH}=9$ con diferentes temperaturas de sinterización.

Figura III.10. Resultados estadísticos del ensayo MTT para muestras de HA con $\text{pH}=11$ con diferentes temperaturas de sinterización.

Figura IV.1. Fragmentos de patrones de DRX para polvos obtenidos por mecano-síntesis y sometidos a un tratamiento de temperatura a 1000°C . (*) denota la fase $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, (o) denota la fase $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, (α) denota la $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Figura IV.2. Relación en las intensidades máximas en función del tiempo de mecano-síntesis después del tratamiento con temperatura en $T_{\text{tr.}} = 1000^\circ\text{C}$. I_1 es la

intensidad de la línea (002) de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. I_2 es la intensidad de la línea (220) de $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Figura IV.3. Fragmentos de espectros de absorción IR de polvos obtenidos por mecano-síntesis (a, a') y tratamiento posterior a la temperatura a 1000°C durante 2 h (b, b'). En (b'), la fase $\beta\text{-TCP}$ se denota por (\bullet), y $\alpha\text{-TCP}$ se denota por (α).

Figura IV.4. Cambio en la intensidad de la banda de absorción a $\nu \sim 1000\text{ cm}^{-1}$ de polvos sometidos a mecano-síntesis para diferentes tiempos y tratamientos térmicos a 1000°C .

Figura IV.5. Espectros de resonancia obtenidos en polvos sintetizados (a) y después de su calcinación a 1000°C durante 2 h (b, c).

Figura IV.6. Cambio en la intensidad de las señales de resonancia en polvos sintetizados (a) y después de su tratamiento de temperatura a 1000°C (b) con el tiempo de mecano-síntesis: (a) señales con $g \sim 2$ (1) y $g \sim 4.2$ (2); (b) señales con $g \sim 3.34$ (3) y $g \sim 4.26$ (4).

Figura IV.7. Micrográficas de partículas de polvo de hidroxiapatita obtenidas por mecano-síntesis durante 7 h (a, b) y después del tratamiento de temperatura a 1000°C (a', b'). En (c, c'), se presentan los contenidos de los elementos en aglomerados.

Figura IV.8. Fragmentos de patrones DRX de polvos obtenidos por mecano-activación (a) y después del tratamiento de temperatura a 1000°C (b). (*) Indica la fase $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, (o) indica la fase $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. El polvo inicial se obtuvo a $\text{pH} = 9$.

Figura IV.9. Fragmentos de espectros de absorción IR de polvos obtenidos por mecano-activación (a, a') y después de su tratamiento térmico a 1000°C durante 2 h (b, b'). En (b'), la fase $\beta\text{-TCP}$ se denota por (\bullet), y la fase $\alpha\text{-TCP}$ se denota por (ν).

Figura IV.10. Espectros de resonancia obtenidos en polvos de HA sometidos a tratamiento mecánico (a) y después de su calcinación a 1000°C durante 2 h (b, c). En (c), las líneas de la estructura hiperfina de los iones Mn^{2+} en HA se indican con o.

Figura IV.11. Cambio en la intensidad de la señal de resonancia en polvos sintetizados (a) y después del tratamiento térmico a $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ (b) con el tiempo de mecano-síntesis. (1) Señal con $g \sim 4.2$ (1), (2) señal con $g \sim 3.4$ (2), (3) señal con $g \sim 2$.

Figura IV.12. Imágenes SEM de agregados de hidroxiapatita obtenidos por el método de precipitación a $\text{pH} = 9$ (a, b), después de la mecanoactivación (a', b') y después del tratamiento de temperatura de polvos mecanoactivados a $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ (a'', b'').

Figura IV.13. Contenidos de elementos en polvo. (a) polvo inicial; (b) polvo después de $T_{\text{tr.}} = 1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ para $t_{\text{tr.}} = 2\text{ h}$; (c) polvo después de la mecanoactivación durante 2 h y $T_{\text{tr.}} = 1000\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{tr.}} = 2\text{ h}$; (d) polvo después de la mecanoactivación durante 7 h y $T_{\text{tr.}} = 1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ para $t_{\text{tr.}} = 2\text{ h}$.

INTRODUCCIÓN

La hidroxiapatita nanométrica (HA) es el componente principal del hueso mineral de un ser humano. El hueso vivo se somete constantemente a un proceso reabsortivo-formativo acoplado conocido como remodelación del hueso. El proceso implica la eliminación y reemplazo simultáneo de hueso a través de diversas actividades específicas de osteoblastos y osteoclastos, con el suministro vascular acompañante y una red de canalículos y lagunas. La HA posee propiedades excepcionales de biocompatibilidad y bioactividad con respecto a las células y tejidos óseos, probablemente debido a su similitud con los tejidos duros del cuerpo. Hasta la fecha, los biomateriales de fosfato de calcio han sido ampliamente utilizados clínicamente en forma de polvos, gránulos, bloques densos y porosos y diversos compuestos que son usados muy comúnmente en implantes de hueso humano.

Las cerámicas de fosfato de calcio, especialmente la hidroxiapatita (HA), se utilizan actualmente muy frecuentemente como biomateriales para muchas aplicaciones en odontología, ortopedia y en muchos campos de la medicina moderna, ya que forman un enlace real con el tejido óseo circundante cuando se implantan [1].

Numerosos biomateriales se han desarrollado como alternativas a los injertos óseos autógenos y alógenos [2]. Estas cerámicas están compuestas de fosfato beta-tricálcico puro (β -TCP) con una relación de calcio a fosfato (Ca / P) de 1,5 o de hidroxiapatita estequiométrica (HA) con Ca / P = 1,67, O de una mezcla de β -TCP y HA (fosfato cálcico bifásico cerámica BCP) con $1,5 < \text{Ca} / \text{P} < 1,67$. Generalmente se preparan mediante reacción sólida a alta temperatura oscilando desde los 1000 – 1200° C, entre una sal de calcio y una sal de fosfato o calentando una hidroxiapatita con poca cristalinidad o hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA). CDHA puede obtenerse por diferentes medios, tales como precipitación en solución a partir de una sal de calcio y una sal de fosfato con un pH controlado.

Debe observarse que algunos factores experimentales, tales como pH, temperatura, tiempo de envejecimiento, lavado o tipo y concentración de materiales de partida, pueden afectar a la cristalinidad, el tamaño de partícula y la relación Ca / P 1.67 del producto final. Las

variaciones en la relación Ca / P de CDHA de un lote a otro conducen a diferencias en los porcentajes de las fases HA y β -TCP de la cerámica BCP resultante después de la sinterización, con posibles consecuencias en relación con su degradabilidad in vivo. El proceso de síntesis necesita estar muy bien controlados los parámetros para obtener CDHA con la relación Ca / P esperada, esto es cercana a la del cuerpo humano.

Los materiales de fosfato de calcio forman la parte mineral principal de los tejidos calcificados. Sin embargo, la presencia de fosfato cálcico en el hueso se presenta en forma de cristales similares a agujas de tamaño nanométrico de aproximadamente 5-20 nm de ancho por 60 nm de longitud, con una fase de apatita no estequiométrica no cristalizada que contiene CO_3^{2-} , Na^+ , F^- y Otros iones en una matriz de fibra de colágeno. La investigación actual se ocupa de las nuevas formulaciones y rutas de síntesis de HA que apuntan a mejores y más eficaces aplicaciones biomédicas, produciendo este material con propiedades más cercanas a las del hueso vivo, tales como las estructuras nanométrica y monolítica.

En comparación con las formulaciones cerámicas convencionales, las propiedades de la nanopartícula HA, tales como el tamaño de grano superficial, el tamaño de poro, la humectabilidad, etc., podrían controlar las interacciones de proteínas (por ejemplo, adsorción, configuración y bioactividad); Por lo tanto, al tener las condiciones idóneas de cristal modula la posterior adhesión mejorada a los osteoblastos y la funcionalidad a largo plazo. [3] descubrieron que estas funciones mejoradas de los osteoblastos se ven reflejada en la proliferación de las células en el tejido nuevo. La topografía del tamaño del grano del nanómetro y la humectabilidad superficial son propiedades del material nanocerámicos que no sólo promueven una adsorción selectiva incrementada de vitronectina (una proteína que media la adhesión de los osteoblastos), sino que también afectan a las conformaciones que mejoran las funciones de los osteoblastos. Existen varios métodos de preparación de cristales de HA descritos en la literatura, incluyendo deposición química húmeda, deposición biomimética, sol-gel y electrodeposición [4].

Se han desarrollado muchas técnicas de síntesis de HA. Estos incluyen síntesis mecanicoquímica [5], preparación de la combustión [6], y diversas técnicas de química húmeda, tales como precipitación directa de soluciones acuosas [6], deposición

electroquímica [7], procedimientos sol-gel [8], síntesis hidrotérmica [9]. Y emulsión o rutas de microemulsión [10], etc. La técnica más comúnmente utilizada para la preparación de polvos de HA es la técnica de precipitación. Varios métodos de precipitación producen cristales de HA en el rango de tamaño nanométrico, sub-nanométrico y micrométrico. Sin embargo, la técnica de precipitación tiene algunas desventajas, por ejemplo, la necesidad del alto valor de pH para evitar la formación de un HA deficiente en Ca y la alta temperatura de sinterización para formar la HA cristalina [10].

El hueso humano se forma básicamente por una fase orgánica y otras fases minerales. En la fase orgánica, las fibras de colágeno sirven como matriz para la precipitación de HA, determinando la estructura de los cristales. El colágeno da al hueso su resistencia elástica. La fase mineral está formada por HA. Varios procesos [10] y [11] se utilizan para producir HA de amplia aplicación como un sustituto temporal para el hueso humano [11.], [12.], [13], [14.] y [15].

Considerando los métodos para preparar HA [16.], [17], [18.], [19], [20], [21], [22], [23] y [24] y la mayoría de ellos pueden ser clasificados en dos grupos según el método de elaboración; Uno en mojado y el otro en seco. La síntesis hidrotérmica se caracteriza por la reacción de soluciones acuosas en recipientes cerrados bajo temperatura y / o presión controladas. El método hidrotérmico ha sido ampliamente utilizado [25] para la preparación de materiales para fines protésicos. Las síntesis mecanicoquímicas ya se ha utilizado para la producir hidroxiapatita, en referencia [26], los autores proponen un método para preparar polvos y cuerpos cerámicos compuestos con una matriz que comprende HA, a través de un método mecano-químico. La cerámica compuesta se obtiene por cocción del polvo a 1250 ° C. En la referencia [27] HA se produce por molienda mecánica utilizando CaO y CaHPO₄ utilizando etanol. En la referencia [28], HA se preparó utilizando pirofosfato de calcio (Ca₂P₂O₇) y carbonato de calcio (CaCO₃), así, en la presente contribución se preparó una mecanosíntesis y mecano activación partiendo de reactivos iniciales como óxido de calcio CaO y (NH₄)₂HPO₄. Los polvos se mezclaron en acetona y agua. La fase HA sólo se obtuvo cuando el polvo se molió en agua. Después de un tratamiento térmico a 1100 ° C durante 1 hora, se obtuvo la fase única de HA.

La molienda es una técnica utilizada principalmente para reducir el tamaño de las partículas de diversos materiales, pero durante los últimos 30 años, también ha sido un método, llamado "aleación mecánica", para la síntesis de materiales avanzados. La aleación mecánica, que es esencialmente un proceso de molienda en seco y de alta energía, es una poderosa técnica para sintetizar todo tipo de materiales, desde metálicos a iónicos [28] o polímeros [29].

Artículos y patentes recientes han demostrado que HA, CDHA o hidroxiapatitas sustituidas pueden obtenerse mediante tratamiento mecánico de suspensiones que contienen sales de calcio y fosfato, [30], [31] o por molienda de los materiales de partida en condiciones secas [32].

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los parámetros óptimos para la obtención de hidroxiapatita con mayor pureza mediante diferentes rutas de síntesis (deposición química, mecano-síntesis, mecanoactivación) así como la caracterización de dicho componente para implantes y/o recubrimientos médicos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desarrollar un material basado en hidroxiapatita pura y cristalina para fines biomédicos.
- Comparar la bioactividad de nuestro material (HA) a diferentes pH.
- Comparar la bioactividad de nuestro material (HA) a diferentes temperaturas de síntesis.
- Evaluar la viabilidad celular en el material (HA).
- Comprobar la sustitución iónica de los elementos ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$).

CAPITULO I. REVISIÓN LITERARIA

I.1. Biocerámicas y fosfatos de calcio

La primera sugerencia de la aplicación de cerámica de alúmina (Al_2O_3) en medicina vino en 1932. Pero el campo de la biocerámica realmente no se desarrolló hasta la década de 1970 con los primeros implantes de cadera usando bolas y tazas de alúmina. Los estudios mostraron que una bola de cerámica era más biocompatible que los metales y proporcionaba una superficie más dura y lisa que disminuía el desgaste. La alúmina es un ejemplo de biocerámica casi inerte. La cerámica bioactiva y los vidrios, materiales que forman un enlace a través de la interfaz entre el implante y el tejido, fueron un desarrollo importante. El primer y más estudiado vidrio bioactivo se conoce como Bio-glass 45S5 y fue desarrollado por Larry Hench y colaboradores de la Universidad de Florida. El primer uso exitoso de este material fue como reemplazo de los huesecillos (pequeños huesos) en el oído medio. También se ha desarrollado una gama de cerámica de vidrio bioactivo.

I.2. Biomateriales

Un biomaterial es un material no viable utilizado en un dispositivo médico destinado a interactuar con sistemas biológicos. Una biocerámica se define como una cerámica utilizada como biomaterial. El campo de la biocerámica es relativamente nuevo; no existió hasta la década de 1970. Sin embargo, muchas biocerámicas no son materiales nuevos. Uno de los más importantes es el Al_2O_3 , que encontramos por primera vez como componente de muchos productos tradicionales de cerámica. Las biocerámicas se clasifican típicamente en subgrupos según su reactividad química en el cuerpo.

Sus reactividades relativas se muestran en la Figura 1.1. Si se implanta un material casi inerte en el cuerpo, se inicia una respuesta protectora que conduce a la encapsulación mediante un recubrimiento fibroso no adherente 1 μm de espesor. Con el tiempo, esto lleva al aislamiento total del implante. Una respuesta similar ocurre cuando se implantan metales y polímeros. En el caso de la cerámica bioactiva, se forma un enlace a través de la interfaz implante-tejido que imita el proceso natural de reparación del cuerpo. Las cerámicas

bioactivas como HA se pueden usar individual o como parte de un compuesto o como un revestimiento. Las biocerámicas reabsorbibles, como el fosfato tricálcico (TCP), en realidad se disuelven en el cuerpo y son reemplazadas por el tejido circundante.

Es un requisito importante, por supuesto, que los productos de disolución no sean tóxicos. Como en el caso de HA, TCP se usa a menudo como recubrimiento en lugar de individualmente. También se usa en forma de polvo, por ejemplo, para rellenar el espacio en el hueso. La Figura I.2 muestra una serie de usos clínicos de biocerámicas. Los usos van de la cabeza a los pies e incluyen reparaciones de huesos, articulaciones y dientes. Estas reparaciones se vuelven necesarias cuando la parte existente se enferma, daña o simplemente se desgasta. Existen muchas otras aplicaciones de productos biocerámicos que incluyen recubrimientos de carbono pirolítico para válvulas cardíacas y formulaciones especiales de vidrio radiactivo para el tratamiento de ciertos tumores.

Se ha observado que los nanomateriales muestran posibilidades interesantes para tales aplicaciones, pero pueden plantear tantos problemas de salud en otras situaciones [33].

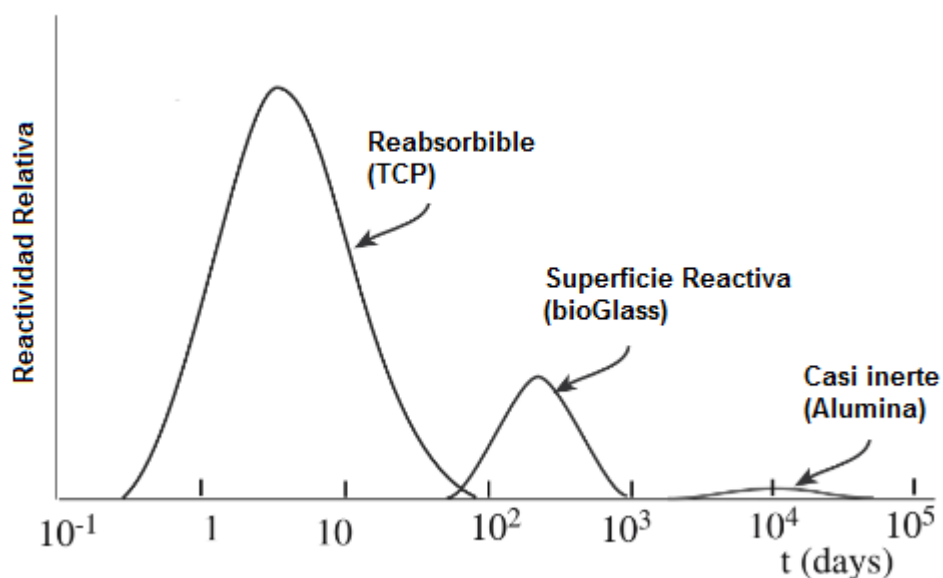


Figura I.1. Reactividad relativa de las diferentes clases de biocerámica. TCP es fosfato tricálcico.

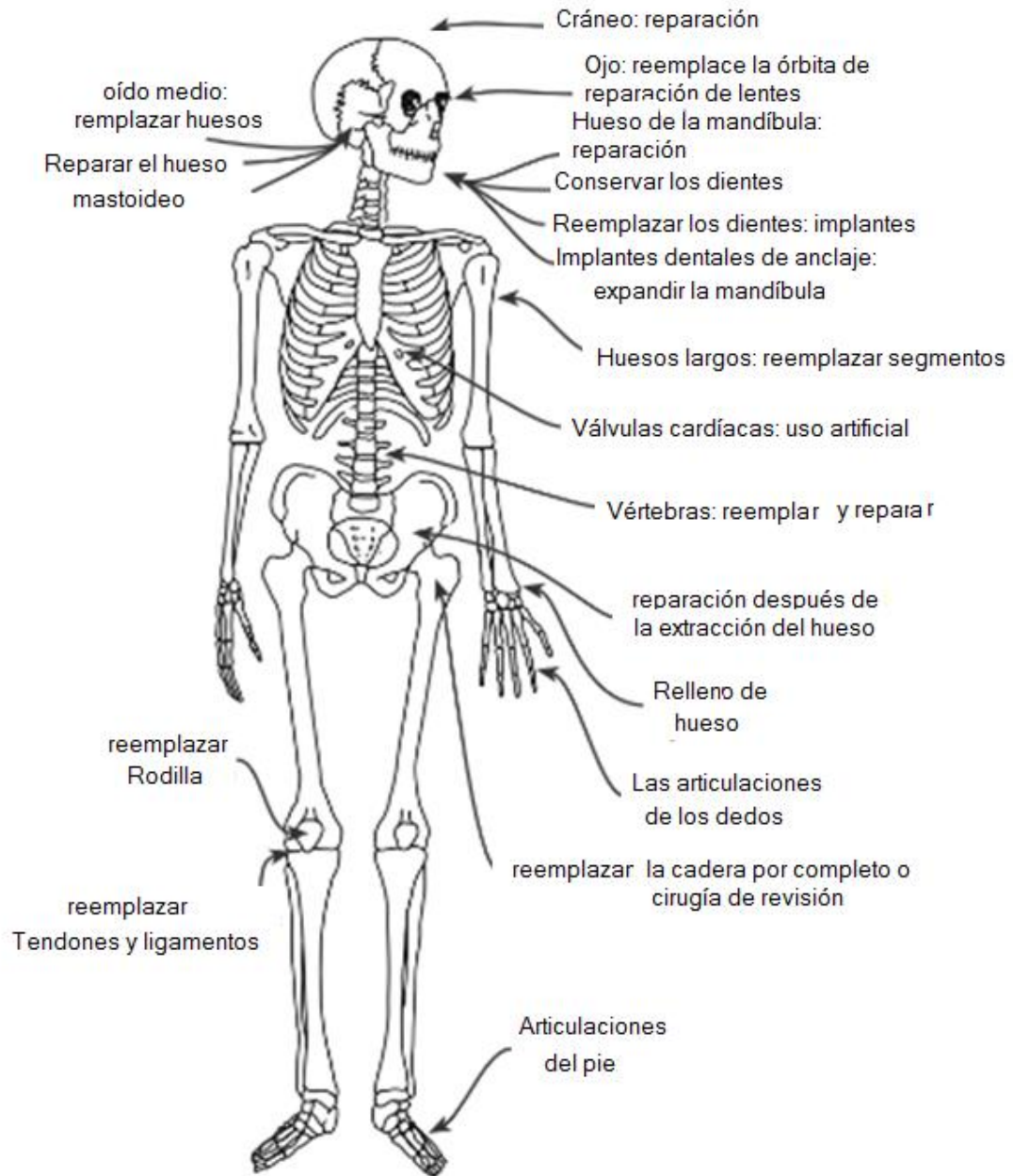


Figura I.2. Ilustración de los usos clínicos de la cabeza a los pies para la biocerámica.

I.3. Ventajas y desventajas de la cerámica

Las tres clases principales de materiales entre los que podemos seleccionar para una aplicación de carga son metales, polímeros y cerámicas. La Tabla I.1 es una lista comparativa de las propiedades físicas significativas de diferentes biomateriales de cada una de las tres clases de materiales clásicos. La Tabla I.2 compara el comportamiento de estas diferentes clases relevantes para su uso potencial como implantes.

Tabla I.1. Características significativas de algunos biomateriales.

Material	Density (g cm ⁻³)	UTS (MPa)	Compressive strength (MPa)	E (GPa)	K _{IC} (MPa m ^{1/2})	Hardness (Knoop)	α (ppm/°C)	Fracture surface energy (J/m ²)	Poisson's ratio
HA	3.1	40–300	300–900	80–120	0.6–1.0	400–4,500	11	2.3–20	0.28
TCP	3.14	40–120	450–650	90–120	1.20		14–15	6.3–8.1	
Bioglasses	1.8–2.9	20–350	800–1200	40–140	–2	4,000–5,000	0–14	14–50	0.21–0.24
A-W glass ceramic	3.07	215	1080	118	2				
SiO ₂ glass	2.2	70–120		–70	0.7–0.8	7,000–7,500	0.6	3.5–4.6	0.17
Al ₂ O ₃	3.85–3.99	270–500	3000–5000	380–410	3–6	15,000–20,000	6–9	7.6–30	0.27
PSZ	5.6–5.89	500–650	1850	195–210	5–8	–17,000	9.8	160–350	0.27
Si ₃ N ₄	3.18	600–850	500–2500	300–320	3.5–8.0	–22,000	3.2	20–100	0.27
SiC	3.10–3.21	250–600	–650	350–450	3–6	–27,000	4.3–5.5	22–40	0.24
Graphite	1.5–2.25	5.6–25	35–80	3.5–12	1.9–3.5		1–3	–500	0.3
LTI-ULTI	1.5–2.2	200–700	330–360	25–40			1–10		0.3
Carbon fiber	1.5–1.8	400–5000	330–360	200–700					
Glassy carbon	1.4–1.6	150–250	–690	25–40		8,200	2.2–3.2		
PE	0.9–1.0	0.5–65		0.1–1.0	0.4–4.0	170	11–22	500–8,000	0.4
PMMA	1.2	60–70	–80	3.5	1.5	160	5–8.1	300–400	
Ti	4.52	345	250–600	117	60	1,800–2,600	8.7–10.1	–15,000	0.31
Ti/Al/V alloys	4.4	780–1050	450–1850	110	40–70	3,200–3,600	8.7–9.8	–10,000	0.34
Ti/Al/Nb/Ta alloys	4.4–4.8	840–1010		105	50–80			–17,000	0.32
Titanium- stellite alloys (Co–Cr–Mn)	7.8–8.2	400–1030	480–600	230	120–160	3,000	15.6–17.0	–5,000	0.30
Low C steel	7.8–8.2	540–4000	1000–4000	200	55–95	1,200–9,000	16.0–19.0	–50,000	0.20–0.33
Fe–Cr–Ni alloys									

Tabla I.2. Comparación general de materiales para implantes

Materiales	Ventajas	Desventajas
Polímeros	Elástico	Débiles
	Dureza	Baja E
	Fácil de fabricar	No reabsorbible
Metales	Fuertes	Pueden corroerse en el medio fisiológico
	Resistente al desgaste	Alta E
	Dureza	Alta densidad
	Fácil de fabricar	No reabsorbible
		Usualmente no bioactivo
Cerámica	Biocompatible	Baja resistencia a la tracción
	Resistente al desgaste	Difícil de fabricar
	Composiciones ligeras	No elástico
		Baja tenacidad

La principal ventaja de la cerámica sobre otros materiales de implantes es su biocompatibilidad: algunos son inertes en el entorno fisiológico mientras que otros tienen una reacción controlada en el cuerpo. Las principales desventajas de la mayoría de las biocerámicas son baja tenacidad (que puede afectar la confiabilidad) Alta E (que puede conducir a la protección contra el estrés). Una de las principales formas de aumentar la dureza de la cerámica es formar un compuesto. La cerámica puede ser la fase de refuerzo, la matriz o ambas. Un ejemplo de un compuesto de matriz de polímero (PMC) reforzado con una biocerámica es polietileno (PE) reforzado con partículas de HA. La dureza del compuesto es mayor que la de HA y es más cercana a la del hueso. Las biocerámicas también se usan como recubrimientos en sustratos metálicos. Un ejemplo es un recubrimiento de vidrio bioactivo sobre acero inoxidable, que utiliza la resistencia y tenacidad del acero y las propiedades de superficie del vidrio.

I.4. Implantes cerámicos y la estructura del hueso

Los requisitos para un implante cerámico dependen de cuál será su función en el cuerpo. Por ejemplo, para una prótesis de cadera total (THP) serán diferentes de los de un implante de oído medio. Sin embargo, hay dos criterios básicos: 1. La cerámica debe ser compatible con el entorno fisiológico. 2. Sus propiedades mecánicas deben coincidir con las del tejido que se reemplaza.

La mayoría de los implantes biocerámicos están en contacto con el hueso. El hueso es un material vivo compuesto de células y un suministro de sangre encerrado en una sólida estructura compuesta. El compuesto consiste en colágeno, que es flexible y muy resistente, y cristales de una apatita de calcio y fosfato, semejante a la hidroxiapatita cálcica; procederemos como si fuera HA. Es el componente HA lo que le da al hueso su dureza. Los cristales aciculares de apatita tienen una longitud de 20-40 nm y una anchura de 1,5-3 nm en la matriz de fibra de colágeno. Dos de los varios tipos de hueso que son más preocupantes en el uso de biocerámicas son:

- Esponjoso (hueso esponjoso)
- Cortical (hueso compacto)

El hueso esponjoso es menos denso que el hueso cortical. Cada hueso del esqueleto tiene una densa capa exterior de hueso compacto que cubre el hueso esponjoso, que tiene la forma de un panal de abejas con forma de aguja o piezas planas llamadas trabeculares. La Figura I.3 es un esquema que muestra una sección longitudinal de un hueso largo. Los espacios abiertos entre las trabeculares están llenos de médula ósea roja o amarilla en los huesos vivos. Debido a su menor densidad, el hueso esponjoso tiene una E más baja y una relación de tensión a falla más alta que el hueso cortical, como se muestra en la Tabla 1.3. Ambos tipos de hueso tienen mayor E que los tejidos conectivos blandos, como tendones y ligamentos. La diferencia entre los diversos tipos de tejidos conectivos asegura un gradiente

suave en el estrés mecánico a través de un hueso, entre los huesos y entre los músculos y los huesos [33].

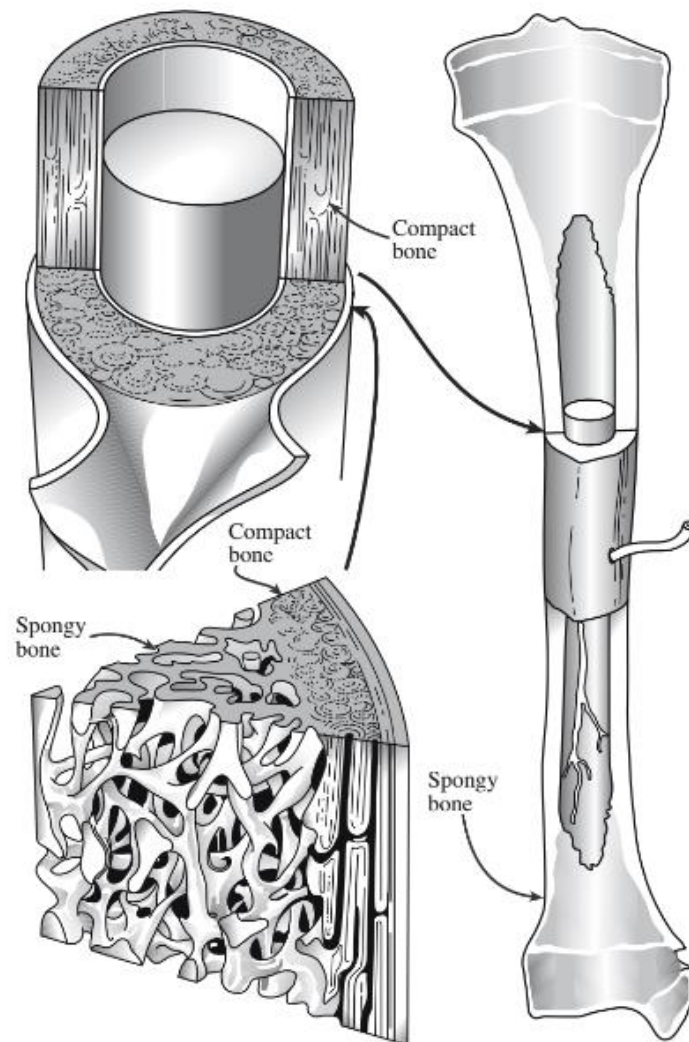


Figura I.3. Sección longitudinal que muestra la estructura del hueso largo.

Tabla 1.3. Propiedades mecánicas de tejido esquelético.

Propiedades	Hueso cortical	Hueso esponjoso	Cartilago articular	Tendon
Fuerza compresiva (MPa)	100–230	2–12		
Fuerza flexible (MPa)	50–150	10–20	10–40	80–120
E (GPa)	7–30	0.5–0.05	0.001–0.01	1
K_{Ic} (MPa m ^{1/2})	2–12			
Rigidez compresiva (N/mm)			20–60	
Modulo de fluencia compresiva (MPa)			4–15	
Rigidez a la tracción			50–225	

Las propiedades mecánicas del implante son claramente muy importantes. La Figura I.4 compara módulo de Young (E) en GPa varios materiales de implantes con los de hueso cortical y esponjoso. El hueso cortical es 10-50 veces menor que el del Al_2O_3 . La E del hueso esponjoso es varios cientos de veces menor que el del Al_2O_3 . Si el implante tiene una gran cantidad de Eof, el hueso que está reemplazando, puede padecer un problema llamado "protección contra el estrés". El blindaje contra el estrés debilita el hueso en la región en la que la carga aplicada es más baja o está en compresión. (El hueso debe cargarse en tensión para mantenerse saludable.) El hueso que está descargado o cargado en compresión experimentará un cambio biológico que conduce a la reabsorción. La

eliminación de la protección contra el estrés, al reducir E, es una de las principales motivaciones para el desarrollo de compuestos biocerámicos.

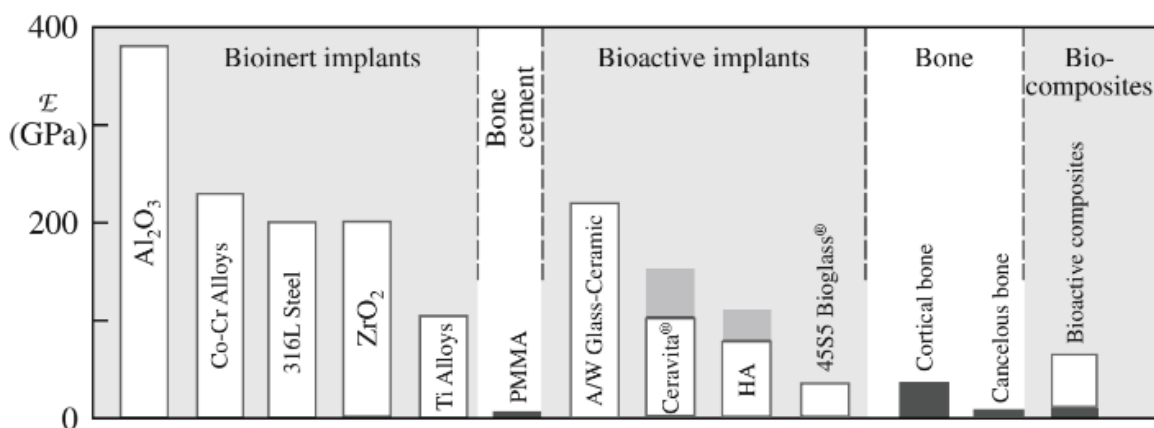


Fig. 1.4. Módulo de Young (E) para varios implantes en comparación con el hueso.

Un requisito importante para cualquier material de implante es que debe durar más que el paciente. Debido a la naturaleza probabilística de la falla en las cerámicas, no es posible proporcionar predicciones de vida específicas y definitivas para cada implante individual.

Aunque las cerámicas de alúmina combinan una excelente biocompatibilidad y una excelente resistencia al desgaste, solo tienen una resistencia a la flexión moderada y una tenacidad baja. Esto limita el diámetro de la mayoría de las prótesis de cabeza femoral de alúmina a 32 mm.

I.5. Hidroxiapatita

La familia de minerales apatita tiene la fórmula general $A_{10}(BO_4)_6X_2$. En HA, o más específicamente, hidroxiapatita cálcica, $A = Ca$, $B = P$ y $X = OH$, la cual es la que se trabajó en este proyecto. La parte mineral de los dientes y los huesos está hecha de una apatita de calcio y fósforo similar a los cristales de HA. El hueso natural es ~70% HA en peso y 50% HA en volumen. La hidroxiapatita es de tipo hexagonal (el grupo espacial es $P6_3/m$) con $a = 0.9432$ nm y $c = 0.6881$ nm. Los iones hidroxilo se encuentran en las

esquinas del plano basal proyectado y se producen a intervalos equidistantes [la mitad de la celda (0,344 nm)] a lo largo de columnas perpendiculares al plano basal y paralelas al eje c. Seis de los 10 iones Ca^{2+} en la celda unidad están asociados con los hidroxilos en estas columnas particulares. Un grupo de tres iones Ca^{2+} que describen un triángulo, que rodea el grupo OH, se encuentra en $z = 0.25$ y el otro conjunto de tres se encuentra en $z = 0.75$. Los seis tetraedros de fosfato (PO_4)³⁻ están en una disposición helicoidal de los niveles $z = 0.25$ y o $z = 0.75$. La red de (3) grupos (PO_4)³⁻ proporciona el marco esquelético que le da estabilidad a la estructura de apatita.

Las sustituciones en la estructura HA son posibles. Las sustituciones para los grupos Ca, PO_4 y OH producen cambios en el parámetro reticular así como cambios en algunas de las propiedades del cristal, como la solubilidad. Si los grupos OH en la HA se reemplazan por los aniones F, están más cerca de los iones Ca^{2+} vecinos. Esta sustitución ayuda a estabilizar aún más la estructura y se propone como una de las razones por las que la fluoración ayuda a reducir las caries dentales, como lo demuestra el estudio de la incorporación de F a HA y su efecto sobre la solubilidad. Las apatitas biológicas, que son las fases minerales de los huesos, el esmalte y la dentina, generalmente se conocen como HA. En realidad, difieren de HA puro en estequiometría, composición y cristalinidad, así como en otras propiedades físicas y mecánicas, como se muestra en la Tabla I.4. Las apatitas biológicas suelen ser deficientes en Ca y están siempre sustituidas con carbonato: $(\text{CO}_3)^{2-}$ -for $(\text{PO}_4)^{3-}$.

Tabla I.4. Composición comparativa y propiedades cristalográficas y mecánicas del esmalte humano, hueso y cerámica de HA.

	Esmalte	Hueso Cortical	HA
Constituyentes (wt%)			
Calcio Ca^{2+}	36.0	24.5	39.6
Fosforo, P	17.7	11.5	18.5
(Ca/P) molar	1.62	1.65	1.67
Sodio, Na^+	0.5	0.7	Trace
Potasio, K^+	0.08	0.03	Trace
Magnesio, Mg^{2+}	0.44	0.55	Trace
Carbonato, CO_3^{2-}	3.2	5.8	—
Fluoruro, F^-	0.01	0.02	—
Cloruro, Cl^-	0.30	0.10	—
totales inorganicos	97.0	65.0	100
totales organicos	1.0	25.0	—
H_2O absorbida	1.5	9.7	—
Propiedades cristalográficas			
Parametro de red			
$(\pm 0.03 \text{ nm})$			
<i>a</i>	0.9441	0.9419	0.422
<i>c</i>	0.6882	0.6880	0.6880
Indice cristalino	70–75	33–37	100
Tamaño de cristal	130 × 30	25 × 2.5–5.0	
Producto después del sinterizado >800°C	HA + TCP	HA + CaO	HA
Propiedades mecánicas			
<i>E</i> (GPa)	14	20	10
Fuerza de tensión (MPa)	70	150	100

Por esta razón, algunas veces se verá apatitas biológicos denominados carbonato apatita y no como hidroxiapatita o HA. Para su uso en aplicaciones biomédicas, HA se prepara en una de dos formas: densas o porosas. El polvo también se puede mezclar con una pequeña cantidad de un aglutinante. Los aglutinantes adecuados son 1% en peso de almidón de maíz y agua, ácido estérico en alcohol o hidrocarburos de bajo peso molecular. Después de

presionar, la cerámica verde se sinteriza en el aire. Las temperaturas de sinterización son de hasta 1300 ° C con tiempos de permanencia en la temperatura máxima de varias horas.

Mediante el uso de técnicas de prensado isostático en caliente (HIP), podemos lograr la densificación a temperaturas mucho más bajas (900 ° C frente a 1300 ° C), en este proyecto se trabajaron con temperaturas de sinterización de 100-1200° C. El uso de temperaturas de sinterización más bajas no solo ahorra en costos de energía, sino que previene la formación de otras fases de fosfato de calcio, como el TCP, que generalmente se forma cuando el HA se sinteriza a $T > 900$ ° C. El aporte también se ha utilizado para formar cerámica HA. Existen muchas aplicaciones para HA densa tanto en forma de bloque como en forma de partículas. Una aplicación importante es el reemplazo de las raíces de los dientes después de la extracción. Los implantes ayudan a minimizar la reabsorción del reborde alveolar y mantienen la forma del reborde después de la pérdida de los dientes, lo que afecta a millones de personas.

La ventaja particular del HA poroso es que permite el crecimiento de tejido hacia los poros, proporcionando una fijación biológica del implante. El tamaño mínimo de poro necesario es ~ 100 μm . Cuando se utiliza como un sustituto de injerto óseo, la HA porosa debe imitar la estructura (o componente estromal) del hueso. La microestructura ideal para la regeneración del hueso cortical es una porosidad interconectada del 65% con tamaños de poro que varían de 190 a 230 μm . El sustituto ideal del injerto para el hueso esponjoso consistiría en un marco delgado de poros interconectados grandes (500-600 μm). Se han utilizado varios métodos para producir cerámicas HA porosas [34].

CAPITULO II. METODOS DE INVESTIGACIÓN DE COMPONENTES INICIALES E HIDROXIAPATITA SINTETIZADA

II.1. Método de difracción de rayos X

Una de las fuentes de información más útiles para los datos de estructura de cristal es el archivo de difracción de polvo (PDF). El PDF es una colección de patrones de difracción de polvo de rayos X monofásicos en forma de tablas de espaciamentos interplanares (d) e intensidades de pico relativas correspondientes. Hay más de 80,000 patrones en el PDF. El XRD de polvos es una de las técnicas más utilizadas para caracterizar la cerámica. El material está en forma de un polvo para que los granos estén presentes en todas las orientaciones posibles de modo que todos los espacios, o valores θ , aparezcan en un patrón. El patrón de polvo clásico se registró en la película fotográfica. Ahora los datos tienen la forma de un diagrama (conocido como difractograma) de recuentos o intensidad frente al ángulo de dispersión (2θ). Una computadora que contiene el PDF completo generalmente se usa para la identificación de picos. En un material multifásico, las cantidades relativas de cada fase se pueden determinar a partir de las áreas de los picos. La XRD se puede utilizar para estimar los tamaños de partículas. La fórmula de Scherrer establece que $\Delta\theta \cdot \Delta x = 2\pi$ donde $\Delta\theta$ es el ancho del pico (ancho medio del ángulo de dispersión) y Δx es el diámetro promedio de la partícula. La resolución del difractómetro corresponde a un ancho integral de 0,32 nm. Las características importantes incluyen lo siguiente: fuente de rayos X. A menudo $\text{Cu K}\alpha = 0.154184$ nm debido a su alta intensidad. La muestra. Por lo general, es un polvo, pero puede prensarse o sinterizarse. Solo se necesitan unos pocos miligramos, y la técnica es no invasiva, las muestras se analizaron principalmente para obtener fases cristalinas de hidroxiapatita, alfa y beta fosfatos mediante un difractómetro con radiación $\text{Cu K}\alpha$ (Difractómetro Siemens D-500), con ángulos que van desde los $10\text{-}60^\circ$ en todas nuestras muestras.

II.2. . Método de Infra-rojo

En la espectroscopia IR, la luz es policromática y se acopla a modos de vibración en el sólido a través de momentos dipolo, que están asociados con la vibración. Estos modos de

vibración provocan una caída en los espectros de transmisión o un pico en los espectros de absorción. El rango IR es de 0.78 a 1000 μm (12.820 a 10 cm^{-1}). La región donde se producen los modos de vibración más fundamentales, que es la más útil para la caracterización de materiales, está entre 2.5 y 25 μm (4000-400 cm^{-1}). Esto a veces se denomina región de IR media. La fuente de luz es una cerámica calentada (generalmente una cerámica conductora o un calentador de alambre revestido con cerámica) que emite un rango de frecuencias. Las principales ventajas de FTIR son que es mucho más rápido porque mide todas las frecuencias simultáneamente y es más sensible que el espectrómetro de dispersión IR, las muestras fueron analizadas mediante un espectrómetro infrarrojo Bruker ALPHA-P-FT-IR con mediciones en la región media del infrarrojo (3500 – 300 cm^{-1}), para obtener señales correspondientes a los enlaces PO_4 , CO_3 y OH.

II.3. Método de microscopia de barrido electrónico

El SEM puede tener dos detectores de imágenes, uno para electrones secundarios (SE) y otro para electrones retrodispersados de mayor energía (BSE). El SEM típicamente tiene una resolución en modo SE de 0.7 nm (a 25 kV) y 2.5 nm en modo BSE a 5 kV. Además de la excelente resolución espacial, la otra gran ventaja del SEM es que tiene una profundidad de campo mucho mayor que el VLM (la profundidad de campo es de varios milímetros). Entonces, las imágenes aparecen más tridimensionales. La razón física de esto es que el haz de electrones es muy estrecho. Los electrones son de baja energía, por lo que son muy sensibles a la topología de la superficie. Las BSE son electrones de mayor energía y son sensibles al número atómico del átomo de dispersión. Por lo tanto, la intensidad de la señal de BSE depende de una combinación del número atómico promedio y la densidad de la cerámica. A medida que se reducen los kilovoltios, el volumen de dispersión se localiza más cerca de la superficie de la muestra. (Los electrones de la EEB penetran más en la muestra y tienen que salir después de dispersarse). Por lo tanto, la imagen BSE puede proporcionar una excelente discriminación de masas, incluso a bajas tensiones en este trabajo se utilizó el microscopio HU-200F LEO VP 1450 con magnificaciones de 10000X.

II.4. Método de resonancia paramagnética (EPR)

La Resonancia Paramagnética Electrónica EPR puede ser establecida como la medición de absorción magnética que tiene un electrón al aplicarse un campo magnético externo también puede ser vista como una extensión del experimento de Stern-Gerlach, quienes mostraron que un átomo con momento magnético neto solo puede tomar orientaciones discretas en un campo magnético. Las aplicaciones de la EPR son muy numerosas y se extienden a diversos campos de investigación de la física, química, geología, biología medicina. Una lista de la aplicaciones de la EPR incluyen: defectos puntuales paramagnéticos en monocristales (tales como: centros de color, electrones desapareados, huecos, vacancias intersticiales, iones de metales de transición y iones de tierras raras), radicales libres en fases sólidas, líquidas o gaseosas, aceptores o donadores en semiconductores y sistemas con más de un electrón desapareado (como sistemas en estado triplete, birradicales y multirradicales). La interpretación de un espectro de EPR debe hacerse en términos del entendimiento mecánico-cuántico de las interacciones de la radiación con la materia y del llamado efecto Zeeman. Clásicamente, la energía de interacción de un dipolo magnético con un campo magnético externo [Weil Jhon et al. 2007]. En el presente trabajo se utilizó un espectrómetro EPR marca Jeol JES TE-300, Tokyo Japón, en la región de banda X a una frecuencia de modulación de 100KHz a temperatura ambiente bajo una presión de 102 mmHg.

II.5. Método de viabilidad celular

Se le llama cultivo celular a la propagación de células fuera del organismo de origen. Los cultivos celulares son el resultado del crecimiento *in vitro* de células obtenidas de organismos pluricelulares. Tienen la categoría de agentes biológicos y se refiere, tanto a los cultivos celulares primarios, como a los de líneas continuas o cepas celulares bien definidas. El microambiente del cultivo puede estar influenciado por la naturaleza del sustrato (sólido, semisólido o líquido), el contacto con otras células, la constitución del medio y la temperatura. La mayoría de las células en cultivo, provenientes de tejidos sólidos, crecen en monocapa, adheridas a una superficie, y después de subcultivar (transferir células de un recipiente de cultivo a otro), requieren volver a adherirse al sustrato antes de proliferar. A su vez, antes de adherirse deben secretar proteínas de MEC y proteoglicanos. Las células cuentan con receptores de superficie específicos para moléculas en la MEC. Hay 3 principales clases de proteínas transmembranales de adhesión: a) CAMs (*cell-cell adhesion molecules*, calcio independientes) y cadherinas (calcio dependiente, Figura 3.3). Ambas participan en interacciones entre células homólogas.

b) Integrinas. Participan en interacciones célula-sustrato (por ejemplo, receptores para fibronectina, laminina, colágeno). Son heterodímeros (subunidad alfa y beta) y su dominio extracelular es muy polimórfico. c) Proteoglicanos. Participan en interacciones célula-sustrato a través de dominios diferentes a las integrinas. Pueden ser receptores de factores de crecimiento de baja afinidad y pueden estabilizar o translocar al factor a su receptor de alta afinidad, en el presente trabajo se realizó el ensayo de viabilidad celular MTT el cual es descrito con detalle a continuación.

CAPITULO III . METODO DE PREPARACIÓN DE HIDROXIAPATITA

III. 1. Síntesis de hidroxapatita por el método de deposición de químico

Para la preparación de los polvos de hidroxapatita fue utilizado el método de deposición química de soluciones. Como componentes de partida utilizados $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ pureza 99,8%(Meyer) (ver Figura III.1). El cambio de PH (8, 9, o 11) se realizó mediante

la adición de una solución de NH_4OH 99.8%(Meyer). Dado lugar a la deposición en la reacción, los productos se obtuvieron después de 2 días, los polvos obtenidos se filtraron, se lavaron con etanol y luego volvieron a filtrar , el secado se realizó a 95°C .

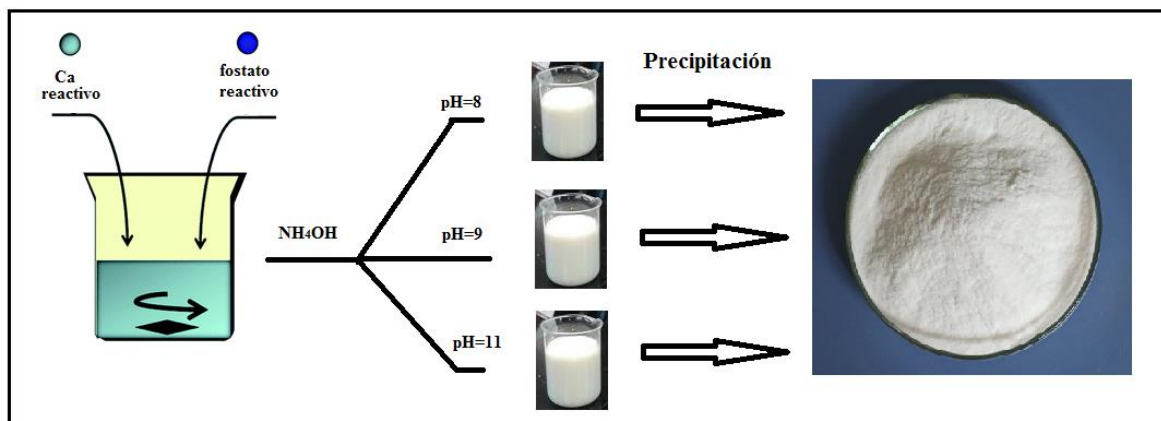


Figura III.1. Esquema común de preparación de hidroxiapatita.

Los estudios de DRX de los productos sintetizados son ilustrados en Figura III.2, estos muestran que están compuestos de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ con una relación $\text{Ca} / \text{P} = 1,67$. Esta relación corresponde con la relación Ca / P del cuerpo humano, que está entre 1,5 y 1,9 [50]. Los polvos sintetizados registraron picos amplios, la mayoría de los cuales son una superposición de los picos adyacentes (Figura III. 3). Esto indica que la estructura cristalina de hidroxiapatita (HA) es un muy defectuosa.

Para evaluar las propiedades de cristalinidad (polvos) de HA se utilizó (002) pico a $2\Theta \sim 26^\circ$ pico y (211) con $2\Theta \sim 32^\circ$. Los resultados mostraron que el aumento del pH de las soluciones iniciales aumenta la intensidad del pico en (002) (Figura III.4 a) y reduce el tamaño de las regiones de dispersión coherente (tamaño de los cristalitas) (Figura III. 4 b). La distancia interplanar (d) a (002) y (211) también depende del pH de las soluciones y el enfoque de los valores estándar (Figura III.4 c, d). Todos los cambios observados pueden deberse a varios factores: diferentes grados de cristalinidad de los polvos (y por lo tanto la diferencia en la anchura de los picos y las características de su superposición individuales), varias composiciones en las fases de las diferentes muestras (y por lo tanto cambiar picos la intensidad de las superposiciones).

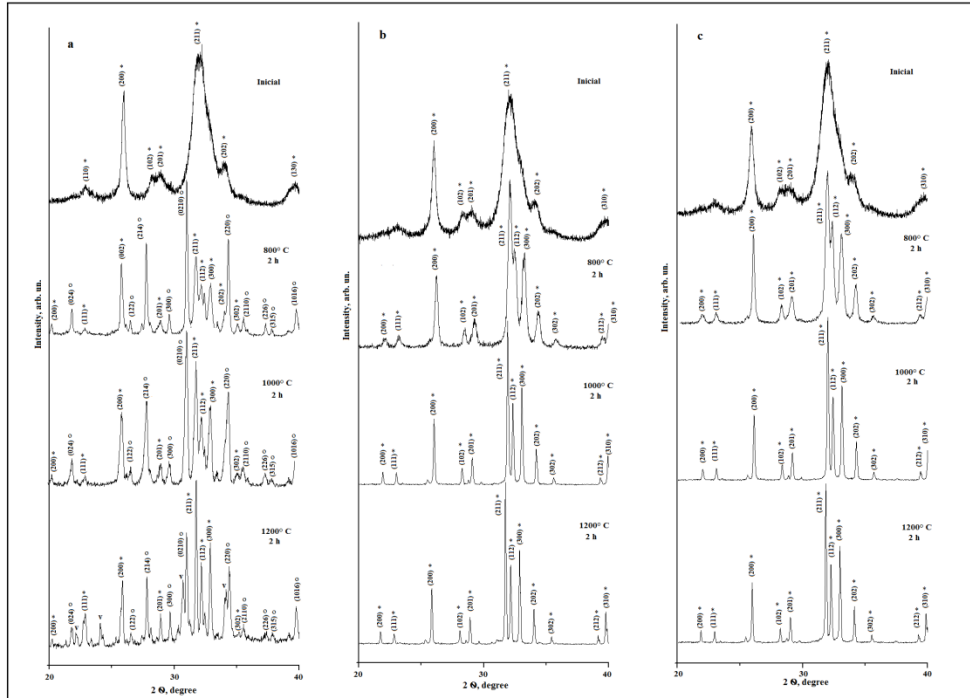


Figura III. 2. Fragmentos de los patrones de difracción de rayos X de polvos obtenidos a partir de soluciones con diferentes pH; (a) pH=8; (b) pH=9; (c) pH=11 y después del tratamiento de temperatura. (*) Para la fase $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, (o) de fase $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, (v) $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

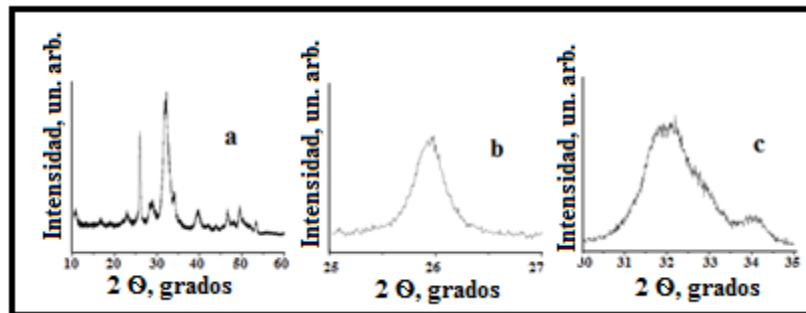


Figura III. 3. Fragmentos de los patrones de difracción de rayos X de polvos obtenidos a partir de soluciones con pH = 8 (a) y los picos de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, con (002) (b) y (211) (c).

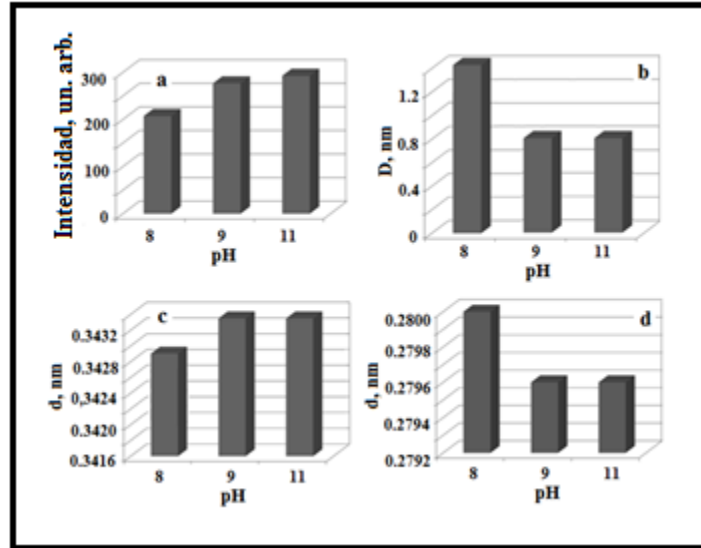


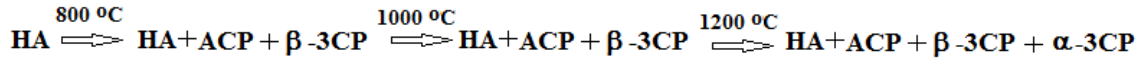
Figura III. 4. Cambio de la intensidad del pico de difracción (a), el tamaño cristalitas (b) y la distancia interplanar (c, d) en polvo $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ en función del pH inicial de la solución madre. En (a, b, c) por (002); (D) de (211).

El resultado de la calcinación (tratamiento térmico) de los polvos sintetizados en la HA registran algunos cambios en los difractogramas y aparecen picos adicionales (Figura III.2). Cuando se trató a 800°C - 1200°C , los polvos obtenidos a partir de soluciones con pH = 9 y 11 se obtuvo que los difractogramas corresponden a $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, el polvo sintetizado a pH 8 y $T_{\text{tr.}} = (800 - 1000)^\circ\text{C}$ son picos más preferentes para la fase vitlokita ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (denotado por 3CA), y al $T_{\text{tr.}} = 1200^\circ\text{C}$ aparece $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Figura III.2 y Figura III.5 a,b). Estas transformaciones son debido a la deshidratación parcial de la hidroxiapatita en un ambiente caracterizado por una mayor acidez, y la posterior conversión de la fase polimórfica $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \rightarrow \beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \rightarrow \alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

La intensidad de los picos (I), el tamaño del cristal (D) y el valor del espacio interplanar (d) HA dependen del tipo de fuente de polvo (es decir, el pH de la solución inicial), la temperatura y el tiempo (véase la Figura III.5 a, c, d, Figura III.6 y Figura III.7).

Típicamente, los polvos obtenidos a partir de las soluciones iniciales a pH = 9 y 11 con el aumento de temperatura y el tiempo de calcinación marcan el estrechamiento de las líneas de difracción de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, el crecimiento de las regiones dispersión coherente (cristalitos), y el valor de $d \sim 0.344$, indica el desarrollo del proceso de cristalización y mejora de la estructura cristalina de los polvos. Sin embargo, los polvos obtenidos a partir de una solución con pH = 8 con el aumento de la temperatura de tratamiento térmico y la duración de la reducción en el contenido de HA se indica por la aparición 3CA. A su vez, la disminución en el contenido 3CA $T_{\text{tr}} > 800$ °C se produce transformación de $\beta \rightarrow \alpha$ (véase la Figura III.2, la Figura III.7. A, y la figura III.8). La reducción de tamaño de los cristalitos de HA con el aumento de T_{tr} hasta 1000 °C (véase la Figura III.7 b) es debido al colapso parcial de los cristales, como resultado de la deshidratación y la formación de 3CA hidroxiapatita. Sin embargo, $T_{\text{tr}} = 1200$ °C entrará en vigor el proceso de sinterización y la consolidación de los granos de HA.

Los espectros IR de los polvos depositados obtenidos de soluciones con diferente pH son típicos de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ nanodispersado (Fig. III.9, Tab. I) [13]. Contienen una pequeña cantidad de H_2O , CO_3 y NO_3 . Sin embargo, después del tratamiento térmico, se observa la eliminación de los productos de reacción residuales y la absorción de humedad y CO_2 . Una característica común de los espectros IR de las muestras tratadas con calor es la ampliación de las principales bandas de absorción de HA con un máximo de $\nu \sim 1022 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_3 \text{ PO}_4^{3-}$) и $\nu \sim 600 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_4 \text{ PO}_4^{3-}$) con el aumento de T_{tr} (**Fig. III.10**) y el desplazamiento de las bandas de absorción, por ejemplo, en el rango (1028-1021) cm^{-1} , (559-549) cm^{-1} . El ensanchamiento (B) y el desplazamiento de las bandas de HA se deben a varios factores: el desarrollo de la deshidratación de HA durante la calcinación, acompañado de la amorfización parcial de HA, la formación de β -3CA con la posterior transición a α -3CA. Dependiendo del contenido de estas fases en los polvos calcinados, las bandas de absorción anteriores son superposicionales y se caracterizan por diferentes valores de B y ν . los datos obtenidos de la espectroscopía IR son consistentes con los aciertos encontrados en el análisis de las fases de rayos X, sin embargo los complementan de alguna manera con el siguiente esquema:



Cuando la HA es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (hidroxiapatita), ACP es $\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (calcio fosfato amorfo), β -, α -3s son modificaciones de CP est $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Las investigaciones del SEM de los polvos obtenidos muestran que los productos de precipitación consisten en agregados de varios tamaños que son fácilmente degradables (Fig. III.11a). después del tratamiento térmico, se observa la consolidación-sinterización de los agregados (Fig. III.11b). El contenido de elementos O,P y Ca en las muestras obtenidas con pH=9 y 11 y procesada hasta 1000°C son típicas para $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Figs. III.11 a' , b'). La relación $\text{Ca/P} = 1.9$, ue difiere de 1.67, son correspondientes a la composición estequiometrica, pero esta dentro del rango de relaciones (1.5-1.9) características del componente mineral del tejido óseo, teniendo en cuenta que este valor de Ca/P indica presencia de fosfato de calcio amorfo [13].

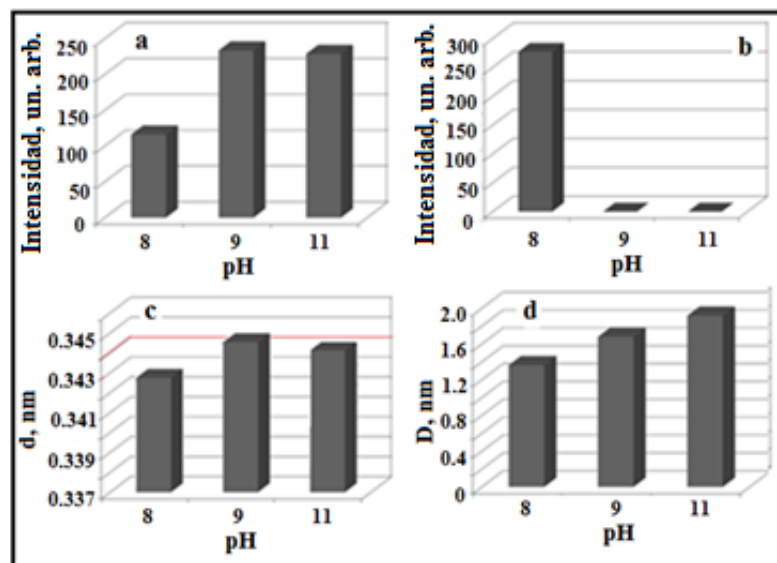


Figura III.5. Cambio de la intensidad de los picos de difracción (a, b), el espaciado interplanar (c) y el tamaño RDC (d) de los polvos calcinados a 800 ° C, dependiendo del pH inicial de la solución inicial. En (a, c, d) por (002) de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, (b) para (211) de $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

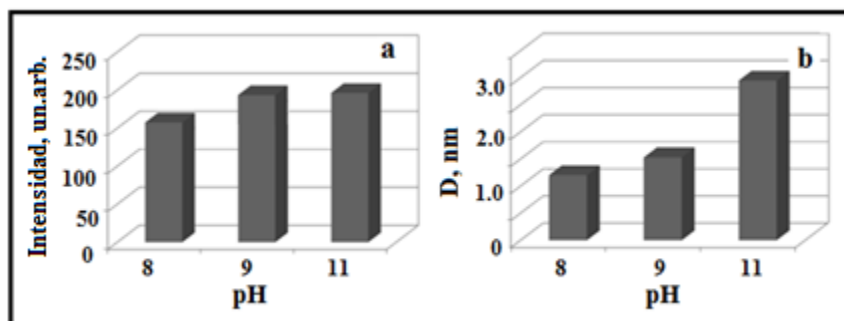


Figura III. 6. Cambio de la intensidad del pico de difracción (002) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (a) y el tamaño de RDC (b) en forma de polvo, se calcinó a 1000 ° C, dependiendo del pH inicial de la solución madre.

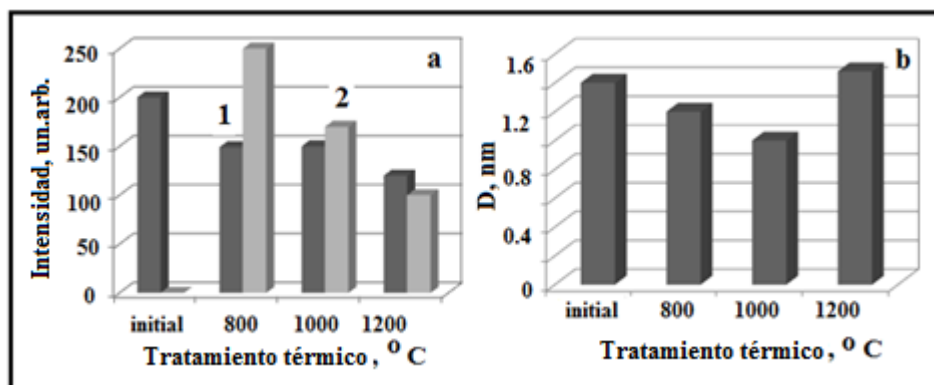


Figura III.7. Cambio de la intensidad del pico de difracción (a) y el tamaño de la República de China (b) dependiendo de la temperatura de los polvos de tratamiento. En (a): (1) el pico de (002) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, (2) pico (211) $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (2). El valor de la solución madre inicial pH = 8.

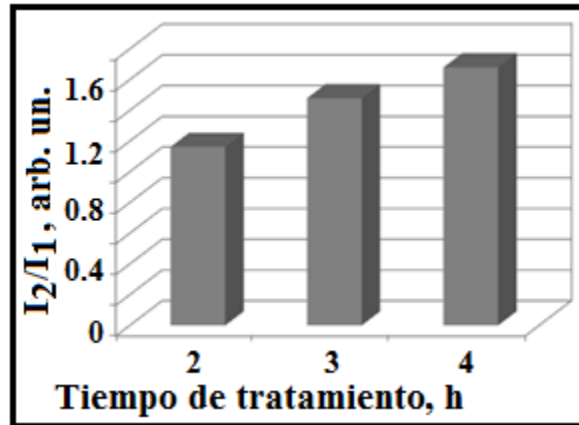


Figura III.8. La relación de las intensidades de pico en función de tiempo de tratamiento termico 1000 °C. I_1 es la intensidad de la línea (002) de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. I_2 es la intensidad de la línea (211) de $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. $T_{\text{tr.}} = 1000 \text{ }^\circ\text{C}$. $\text{pH} = 8$.

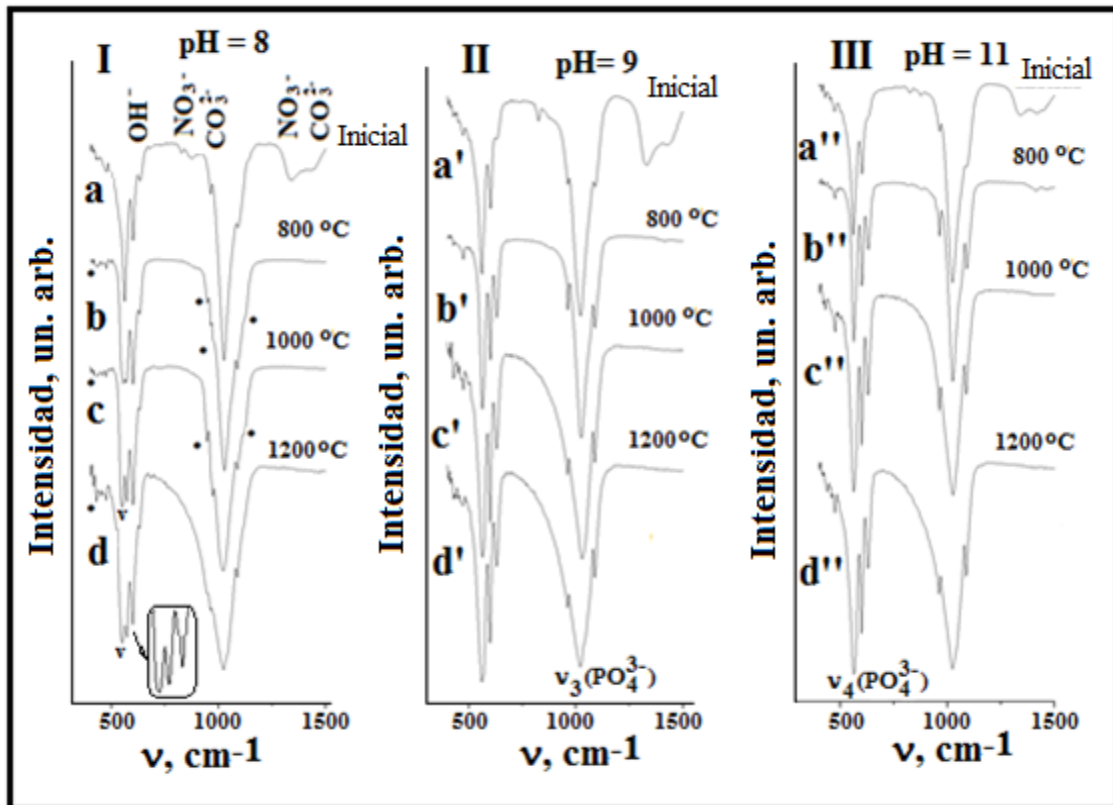


Fig. III.9. Gráficos de espectros de absorción IR de polvos sintetizados (a, a', a'') y después de su procesamiento en 800° C (b, b', b''), 1000° C (c, c', c'') y 1200° C (d, d', d''). $t_{tr.} = 2$ h. (•) β -3CA, (v) α -3CA.

Table I. Absorción de bandas FTIR con polvos sintetizados en la región 400-1500 cm^{-1} .

tipo de muestra		absorción de bandas, cm^{-1}	fases y grupos químicos
pH	T, °C		
8	inicial	427; 473; 559.6 ; 601.4; 632.7; 827.9; 872.6; 960.4; 1025.6 ; 1090; 1142.7; 1340.4; 1436.9	HA; H ₂ O, OH ⁻ , CO ₃ ²⁻ , NO ₃ ⁻
	800	432.4; 476.6; 557.1 ; 567.6 ; 601.4; 630; 945; 960.4; 973.7; 1028.1 ; 1059.4; 1088; 1188; 1124.6	HA+ β -3CA; OH ⁻
	1000	432.4; 476.6; 549.5 ; 569 ; 601.4 ; 635.2; 945.4; 970.9; 1020.4 ; 1088; 1119.4	HA+ β -3CA; OH ⁻
	1200	427; 473.8; 552 ; 550 ; 601.4; 632.7; 945; 960.4; 963.2; 1022.8 ; 1046.5; 1088; 2219.4	HA+ α -3CA; OH ⁻
9	inicial	427.3; 473.8; 561.68 ; 598.6; 632.8; 827.9; 963.2; 1025.6 ; 1093.2; 1330.2; 1431.68	HA; H ₂ O, OH ⁻ , CO ₃ ²⁻ , NO ₃ ⁻
	800	429.6; 474.5; 562.4 ; 598.6; 632.1; 963.2; 1022.8 ; 1088.7	HA; OH ⁻
	1000	427.8; 473.8; 510.4; 561.7 ; 598.6; 630; 957.9; 1030.84 ; 1088	HA; OH ⁻
	1200	430; 471.4; 559.6 ; 632.8; 630; 960.4; 1020.4 ; 1090.8	HA; OH ⁻
11	inicial	427.1; 473.8; 502.4; 562.4 ; 598.6; 635.2; 822.7; 877.1; 961.1; 1022.8 ; 1090.8; 1338.6; 1421.2	HA; H ₂ O, OH ⁻ , CO ₃ ²⁻ , NO ₃ ⁻
	800	473.1; 564.8 ; 598.6; 632; 874.7; 963.2; 1025.6 ; 1093.2; 1410.7; 1470.7	HA; OH ⁻
	1000	427.1; 473.8; 564.8 ; 598.6; 630; 963.2; 1023.5 ; 1088	HA; OH ⁻
	1200	434.8; 476.6; 559.6 ; 598.6; 627.6; 963.2; 1025.6 ; 1090.8	HA; OH ⁻

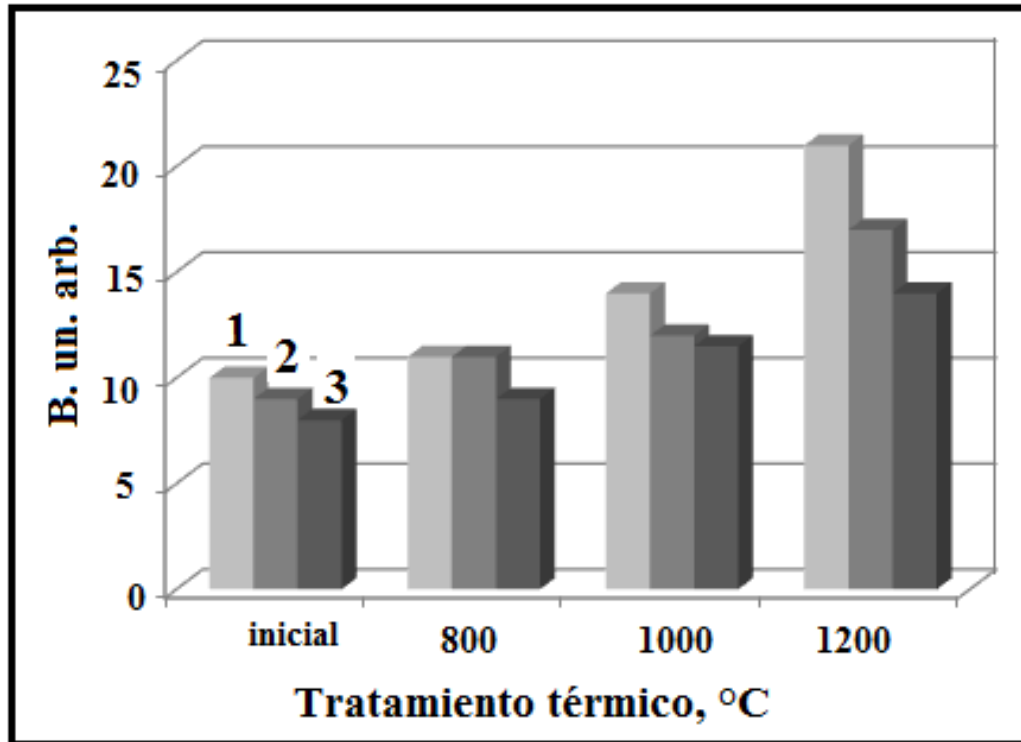


Fig. III.10. Cambio en el ancho de absorción después de 1022 dependiendo de la temperatura de procesamiento de los polvos. Los polvos se obtuvieron a pH= 8(1), a pH=9(2), y pH=11(3).

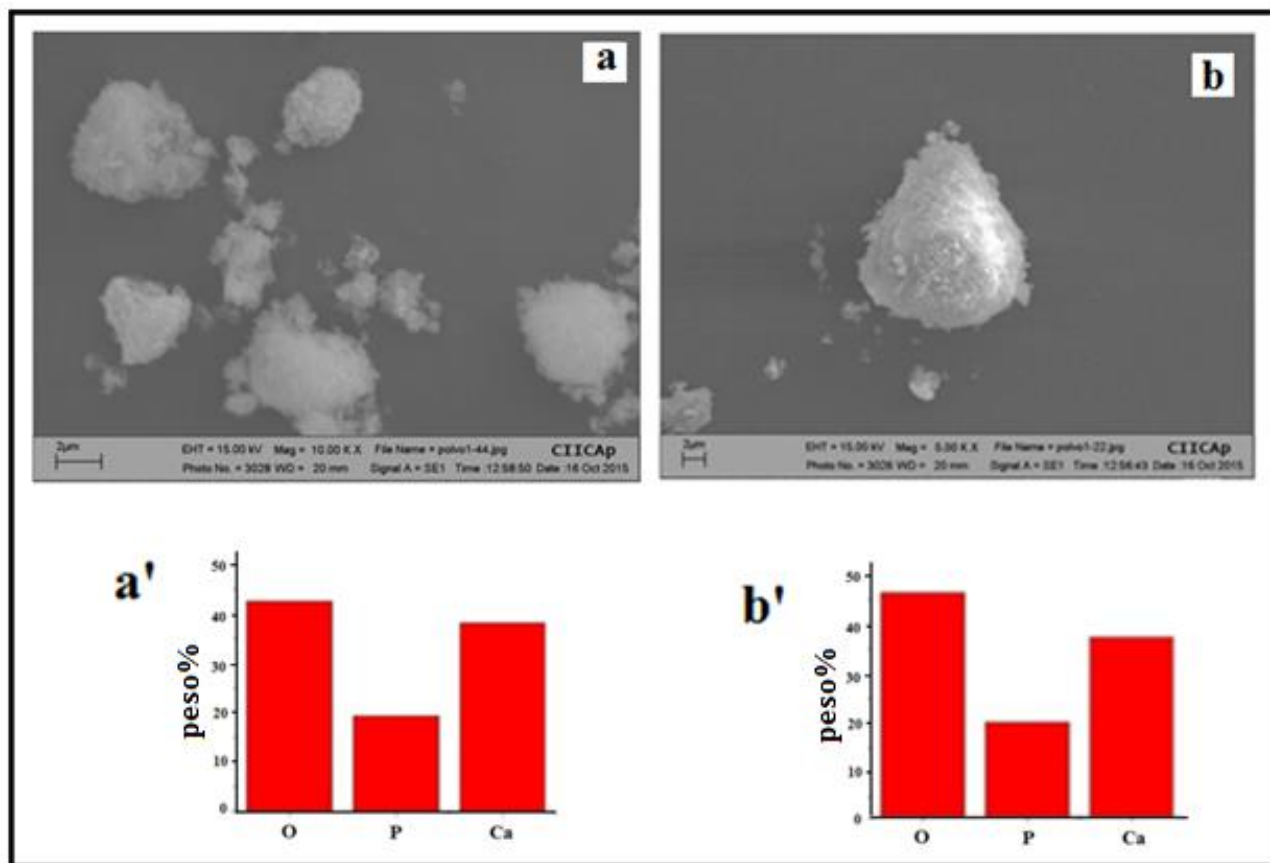


Fig. III.11. Imagen de SEM de agregados de hidroxiapatita obtenidos por el método de precipitación (a) y después del tratamiento a 1000 °C (b). En (a') y (b') son los contenidos de los elementos en los agregados (a, b). pH = 9.

III.2. Granulación de polvos de hidroxiapatita

III.2.1. Metodo de preparación

La granulación es un proceso de diseño de partículas mediante el cual pequeñas partículas se juntan para formar aglomerados físicamente fuertes.

La razón por la que se granularon los polvos de hidroxiapatita es principalmente para fines prácticos de localización del implante; mejorar la uniformidad de los polvos; mejorar las características de compresión y dar mejor apariencia a los polvos de HA.

Gracias a la granulación de nuestro material se lograron algunas propiedades como la distribución de tamaño controlado, densidad aparente específica, y estabilidad estructural adecuada y resistencia física. Existen diferentes técnicas de granulación como húmeda de alto cizallamiento, de lecho fluido, humedad de baja cizalla, por aspersion, congelado por pulverización, en el presente trabajo se realizó por el método.

III.2.2. Parámetros del proceso de granulación

Velocidad del impulsor: Las velocidades más altas del impulsor generalmente dan como resultado gránulos más densos y más pequeños. Las bajas velocidades del impulsor generalmente resultan en gránulos más porosos y grandes.

La velocidad del impulsor: generalmente no tiene un efecto significativo en el tamaño y la densidad de los gránulos, pero en los casos en que la hélice es grande, puede funcionar como un impulsor secundario. La tasa de adición de agua es crítica para la calidad del gránulo. En general, la tasa de adición de agua se elige de manera que la sobrehumación local de la masa del polvo no es una preocupación y, al mismo tiempo, la tasa de adición es lo suficientemente rápida como para acomodar los tiempos de procesamiento (~ 2 -5 minutos para la adición de agua).

El tiempo de masificación: es normalmente del orden de 1 a 10 minutos. Los tiempos de masificación prolongados (> 20 min) pueden reducir la velocidad de disolución debido a la disminución de la función disgregante o a la formación de gránulos más densos.

Carga del Mezclador: Generalmente, la carga del mezclador es menos de dos tercios del volumen del mezclador.

Para la preparación de los gránulos de HA se realizó una solución de grenetina al 10% (10 g de grenetina + 90 mL de agua), se pesaron 5 g de polvos de hidroxiapatita los cuales se añadieron a la solución de grenetina y se homogenizaron con calentamiento y agitación. Se colocaron 250 mL de aceite vegetal a una temperatura de 8 °C y se llevó a agitación a 450 RPM con lo cual gota a gota se fue mezclando la solución grenetina-HA con el aceite hasta terminar con la solución; los gránulos obtenidos se lavaron con acetona por triplicado y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 5 días; el control de tamaño se realizó por medio de tamices que iban desde los 100 µm. En la Fig III.6 se muestra la relación que existe entre el tiempo de granulación, la velocidad del impulsor para obtener diferentes tamaños de gránulos.

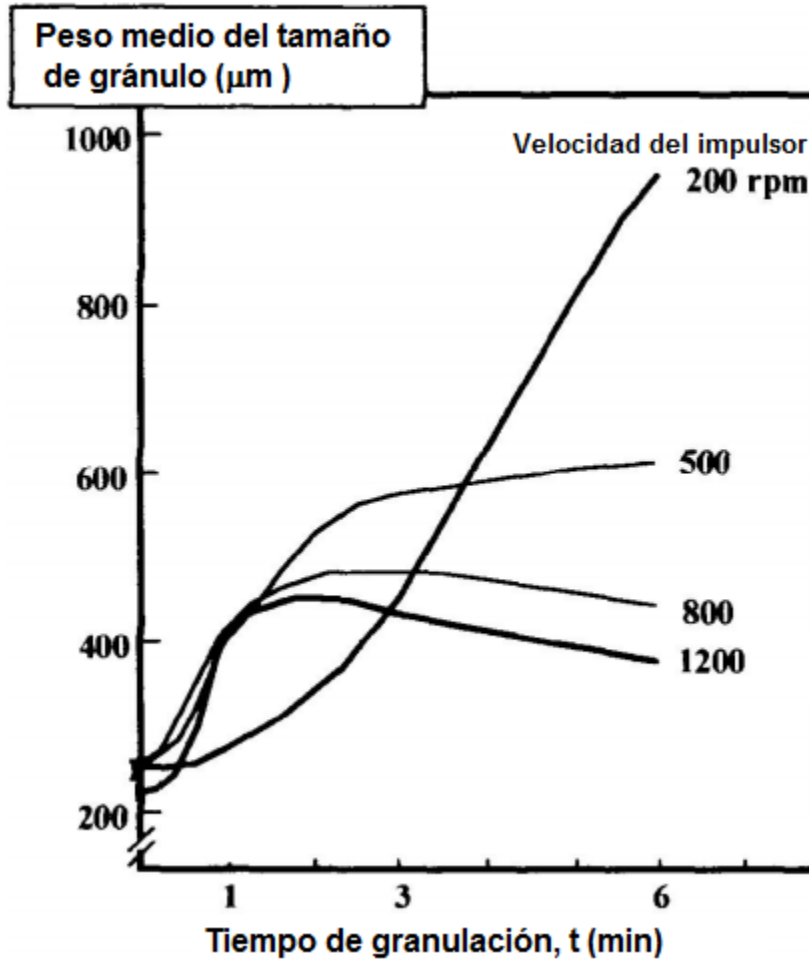


Figura III.6. Efecto de la velocidad del impulsor en el proceso de granulación.

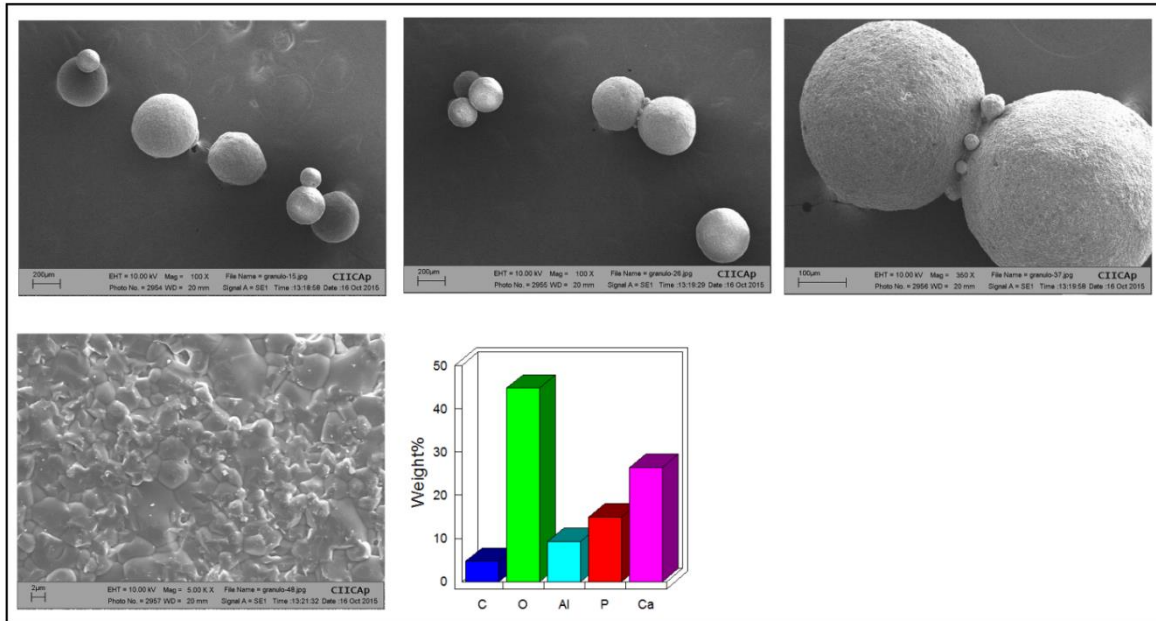


Figura III.7. Imagen de SEM de hidroxiapatita granulada con pH=9 (a,b,c) y contenido de elementos en los granulos (d,e).

III.3. Pruebas in – vitro para muestras de HA obtenida por el método de deposición química

III.3.1. Descripción del método MTT

El ensayo de reducción de MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) tetrazolio fue el primer ensayo de viabilidad celular homogéneo desarrollado para un formato de 96 pocillos para el cribado de alto rendimiento (HTS) [35]. El sustrato de MTT se prepara en una solución fisiológicamente equilibrada, se añade a las células en cultivo, usualmente a una concentración final de 0,2 - 0,5 mg / ml, y se incuba durante 1 a 4 horas. La cantidad de formazán (presumiblemente directamente proporcional al número de células viables) se mide registrando los cambios en la absorbancia a 570 nm usando un espectrofotómetro de lectura de placas. En algunas ocasiones se utiliza una longitud de onda de referencia de 630 nm, pero no es necesaria para la mayoría de las condiciones de ensayo [36].

Las células viables con metabolismo activo convierten el MTT en un producto de formazán de color púrpura con un máximo de absorbancia cercano a 570 nm (Figura III.8). Cuando las células mueren, pierden la capacidad de convertir MTT en formazan, por lo tanto la formación de color sirve como un marcador útil y conveniente de sólo las células viables. El mecanismo celular exacto de la reducción del MTT en formazan no es bien entendido, pero probablemente involucre la reacción con NADH o moléculas reductoras similares que transfieren electrones a MTT [37]. La especulación en la literatura temprana que implica enzimas mitocondriales específicas ha llevado a la suposición mencionada en numerosas publicaciones que MTT está midiendo la actividad mitocondrial [38].

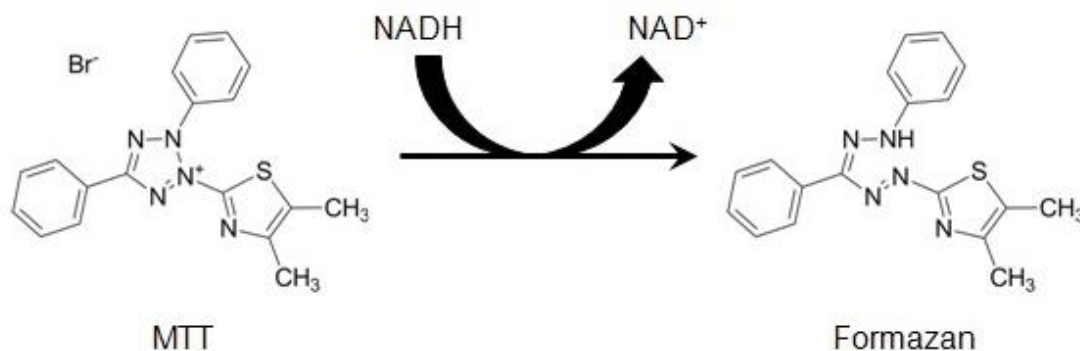


Figura III.8. Estructuras de MTT y producto de formazano coloreado

El producto formazano del tetrazolio MTT se acumula como un precipitado insoluble dentro de las células así como se deposita cerca de la superficie celular y en el medio de cultivo. El formazano debe solubilizarse antes de registrar las lecturas de absorbancia. Se han utilizado diversos métodos para solubilizar el producto de formazano para estabilizar el color, evitar la evaporación y reducir la interferencia por el rojo de fenol y otros componentes del medio de cultivo [39]. Varios métodos de solubilización incluyen el uso de isopropanol acidificado, DMSO, dimetilformamida, SDS y combinaciones de detergente y disolvente orgánico. La acidificación de la solución solubilizante tiene el beneficio de cambiar el color del rojo fenol al color amarillo que puede tener menos interferencia con las lecturas de absorbancia. El pH de la disolución de solubilización puede ajustarse para

proporcionar una absorbancia máxima si la sensibilidad es un problema [40]; Sin embargo, otras tecnologías de ensayo ofrecen una sensibilidad mucho mayor que MTT.

La cantidad de señal generada depende de varios parámetros, incluyendo: la concentración de MTT, la duración del período de incubación, el número de células viables y su actividad metabólica. Todos estos parámetros deben ser considerados al optimizar las condiciones de ensayo para generar una cantidad suficiente de producto que se puede detectar por encima del fondo.

La conversión de MTT a formazán por células en cultivo es dependiente del tiempo. Un tiempo de incubación más largo resultará en una acumulación de color y una mayor sensibilidad hasta un punto; Sin embargo, el tiempo de incubación es limitado debido a la naturaleza citotóxica de los reactivos de detección que utilizan energía (equivalentes reductores tales como NADH) de la célula para generar una señal. Para las poblaciones de células en crecimiento en fase logarítmica, la cantidad de producto de formazán es generalmente proporcional al número de células viables metabólicamente activas como se demuestra por la linealidad de respuesta. Las condiciones de cultivo que alteran el metabolismo de las células probablemente afectarán la tasa de MTT en formazan. Por ejemplo, cuando las células adherentes en el cultivo se aproximan a la confluencia y el crecimiento se convierte en contacto inhibido, el metabolismo puede disminuir y la cantidad de MTT reducción por célula será menor. Esta situación conducirá a una pérdida de linealidad entre la absorbancia y el número de células. Otras condiciones de cultivo adversas tales como pH alterado o agotamiento de nutrientes esenciales tales como glucosa pueden conducir a un cambio en la capacidad de las células para reducir MTT [41].

Se realizaron doce ensayos de viabilidad celular por el método MTT de tabletas de hidroxiapatita ver Tabla III.1.

Tabla III.1. Composición de las muestras para los ensayos de viabilidad celular.

TABLETAS	TEMPERATURA, ° C
HA, pH =8	INICIAL
HA, pH =8	800
HA, pH =8	1000
HA, pH =8	1200
HA, pH =9	INICIAL
HA, pH =9	800
HA, pH =9	1000
HA, pH =9	1200
HA, pH =11	INICIAL
HA, pH =11	800
HA, pH =11	1000
HA, pH =11	1200

III.3.2. Características de las células de trabajo SAOS – 2 (ATCC HTB-85)

El número de cromosomas de la línea madre es hipotriploide con el número modal de 56 cromosomas por célula y el componente 2S ocurre al 13,2%. Más de dos tercios del cromosoma complemento consistió en cromosomas estructuralmente reordenados. La mayoría de los cromosomas marcador tenían complejos reordenamientos. No se pudo identificar el origen de los segmentos que componen estos marcadores. De los marcadores identificables, 6p + / q +, 7p +, 11p + y 12p + ocasionalmente estaban presentes a 2 copias por célula. El cromosoma Y no se detectó en la preparación manchada con QM.

III.3.3. Expresión del antígeno

Expresión del antígeno: Tipo sanguíneo B, Rh +; HLA A2, A3, Bw16, Bw47

Descogelación y activación de células SAOS – 2 (ATCC HTB-85)

III.3.4. Medio de Crecimiento Completo

El medio base para esta línea celular es el 5º medio modificado ATCC McCoy modificado, no. de catálogo 30-2007. Para preparar el medio de crecimiento completo, añadir los siguientes componentes al medio base: suero bovino fetal hasta una concentración final del 15%, penicilina – estreptomicina 1 mL.

III.3.5. Subcultivo

Eliminar el medio y enjuagar con tripsina al 0,25%, disolución de EDTA al 0,03%. Retire la solución y agregue 1 a 2 mL adicionales de solución de tripsina-EDTA. Dejar reposar el matraz a temperatura ambiente (o a 37 ° C) hasta que las células se separen. Añadir medio de cultivo fresco, aspirar y dispensar en nuevos frascos de cultivo. Para el subcultivo de este producto se recomiendan los frascos.

Proporción de subcultivo: Se recomienda una proporción de subcultivo de 1: 2 a 1: 4

Renovación media: 1 a 2 veces por semana.

III.3.6. Crioconservación

Medio de cultivo, 95%; DMSO, 5%

III.3.7. Condiciones de cultivo

Atmósfera: aire, 95%; Dióxido de carbono (CO₂), 5%; Temperatura: 37 ° C

III.3.8. Cultivo de células

Se cultivaron células SAOS-2 en un frasco de cultivo celular de 50 mL adicionando 7 mL de medio Mc Coy (SFB 15%, 15 mL; penicilina-estreptomicina 1 mL) ; se dejaron en incubación en CO₂ a 37°C durante 48 horas; pasadas las 48 horas de cultivo se observó una confluencia celular del 70% dentro del frasco de cultivo.

III.3.9. Protocolo del ensayo MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio)

1. Retirar el medio de la caja de cultivo; hacer un lavado con PBS 1X; colocar 2 mL de tripsina al 2.5%, incubar durante 5 minutos a 37 °C en atmosfera de CO₂.
2. Inactivar la tripsina con 2 mL de PBS, retirar el contenido del frasco de cultivo y colocar el contenido en un tubo de ensayo para centrifugar a 1500 RPM durante 5 minutos.
3. Decantar el sobrenadante y colocar 5 mL de medio; resuspender vigorosamente para despegar las células del fondo del tubo.
4. Tomar 10 µL del contenido de células y colocar en la cámara de Neubauer para el conteo de células.
5. Colocar las tabletas de hidroxapatita en cada pozo de la caja de Elisa por triplicado.
6. Colocar la misma densidad de células en cada pozo de la placa de Elisa (2x10⁵ cel/pozo).
7. Dejar incubar a 37°C durante 48 horas en atmosfera de CO₂.
8. Pasadas las 48 horas de contacto con nuestro material extraer las tabletas de cada pozo y tripsinizarlas con 2 mL de tripsina.
9. Tomar el contenido de medio de las tabletas y pasarlos en tubos eppendorf para centrifugar a 1500 RPM durante 5 minutos.
10. Decantar el sobrenadante y colocar 100 µL de medio para despegar el pellet.
11. Tomar el contenido del tubo y colocarlo en una caja Elisa de 96 pozos.
12. Añadir 10 µl de solución MTT por pocillo para lograr una concentración final de 0,45 mg / ml.
13. Incubar 4 horas a 37 ° C en atmosfera CO₂.
14. Extraer la placa de cultivo u añadir 100 µl de solución de solubilización a cada pocillo para disolver los cristales de formazano.
15. Mezclar por pipeteo para asegurar la solubilización completa.
16. Leer mediante espectrofotometría la absorbancia a 570 nm de las muestras.

III.3.11. Microscopia Confocal y Tinción de Muestras

Para obtener las micrografías con el microscopio confocal las células Saos-2 se cultivaron a una densidad de 2×10^5 cel/mL en tabletas con diferentes condiciones de pH y T en medio de cultivo como se describió previamente. Al alcanzar la confluencia observada en la placa de cultivo de control, las células se retiraron del cultivo y se lavaron dos veces con 1x PBS filtrado. Posteriormente, Saos-2 se fijaron con formaldehído al 4% (sigma) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se tiñeron durante 15 minutos a temperatura ambiente con Hoechst 33342 (0.1/g/mL; sigma) para visualizar el ADN. Se mantuvieron en PBS 1x después del lavado y se analizaron por microscopia confocal con un microscopio confocal laser vertical Olympus FV1000 BX61W1 (Olympus Miami, FL) con un objetivo de 60 X y un zoom digital de 1X. se obtuvieron secciones de 1 μ m. para la cuantificación de núcleos, se generaron imágenes de proyecciones de máxima intensidad (MIP) a partir de pilas de secciones ópticas confocales. El filtro de desenfoque gaussiano se aplicó a las imágenes MIP y se utilizó un umbral (método Huang) para generar imágenes binarias. Después de que las imágenes se procesaron con el comando de cuenca hidrográfica y los núcleos segmentados se contaron con el comando analizador de partículas. Se obtuvieron micrografías de modelos tridimensionales utilizando el comando del visor 3D. Las imágenes se procesaron con el software de dominio público Fiji (NIH).

III.3.12. resultados de pruebas in vitro

Los ensayos de viabilidad celular mostraron que para las tabletas de hidroxiapatita que fueron sometidas a tratamiento térmico en todos los casos las células sobrevivieron y proliferaron. Para el caso de las tabletas de hidroxiapatita que no fueron tratadas térmicamente, al entrar en contacto con el medio que contenía las células se tornó de inmediato con color amarillo y no se mostró crecimiento celular ; esto posiblemente por la solubilización de los reactivos de la muestra con el medio de cultivo (Figura III.9).

Los datos obtenidos por el método MTT que se realizaron con tabletas de hidroxiapatita pH= 8 a diferentes temperaturas (800, 1000, 1200 °C) mostraron que la proliferación de las células depende del pH y el tratamiento térmico, debido a estas condiciones las tabletas que no son tratadas térmicamente las células murieron casi al contacto con el material.

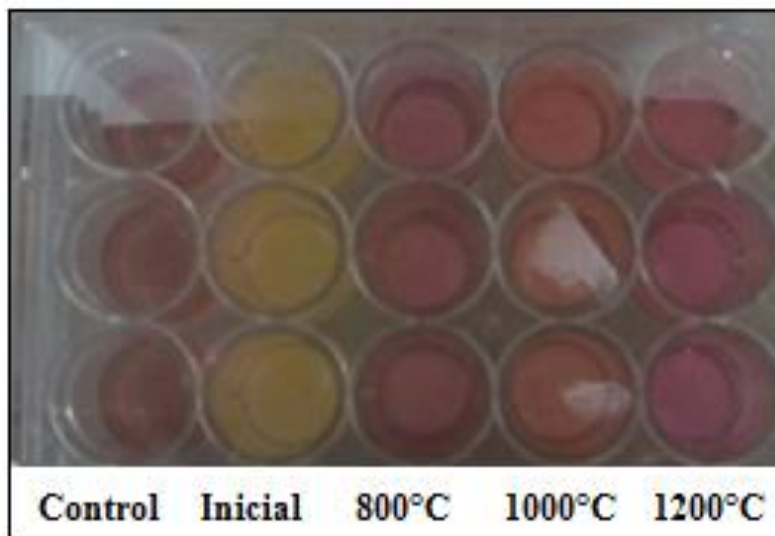


Figura III.9. Placa de 96 pocillos, indicando las pastillas de hidroxiapatita con diferentes parámetros de temperatura.

Por el contrario las tabletas que fueron tratadas térmicamente (Tr. 800, 1000, 1200°C), se mostró la proliferación celular en diferentes proporciones las cuales fueron cuantificadas con el método colorimétrico MTT y demostró que en las tabletas (HA) procesadas con pH=8 las células fueron viables y proliferaron, sin embargo, no llegaron a la misma cantidad en comparación con las células control (Fig. III.10). Las células que fueron sembradas en las tabletas (HA) procesadas con pH=9, se encontró que la proliferación celular fue favorable ampliamente (Fig. III.11), las condiciones de este tipo de tabletas favorece a la proliferación celular gracias a la cristalinidad de nuestro material adquirida mediante el proceso de síntesis y los parámetros que se decidieron implementar en dicho experimento; las células que fueron sembradas en tabletas de hidroxiapatita con pH=11 proliferaron hasta sobrepasar las células control excepto en el caso de la que fue tratada a temperatura de 800°C pues a esta temperatura según los datos analizados con DRX muestra un pequeño decremento en las fases cristalinas de HA y acompañado de mayor desarrollo de de β -3CA con la posterior transición a α -3CA (Fig.III.12). Los resultados obtenidos con el método MTT son congruentes con los estudios de DRX, IR, y esto se ve reflejado en las micrografías confocales las cuales se tomaron para revelar la confluencia y crecimiento en

capas de las células en las tabletas anteriormente descritas (Fig.III.13) en comparación con las células control que su crecimiento fue en monocapa.

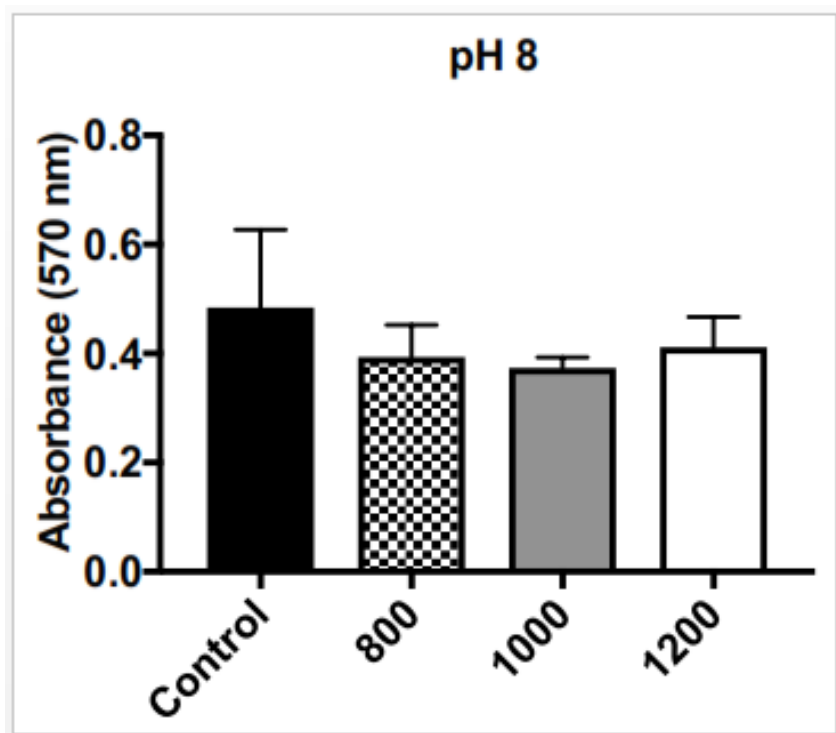


Figura III.10. Resultados estadísticos del ensayo MTT para muestras de HA con pH=8 con diferentes temperaturas de sinterización (800, 1000,1200°C).

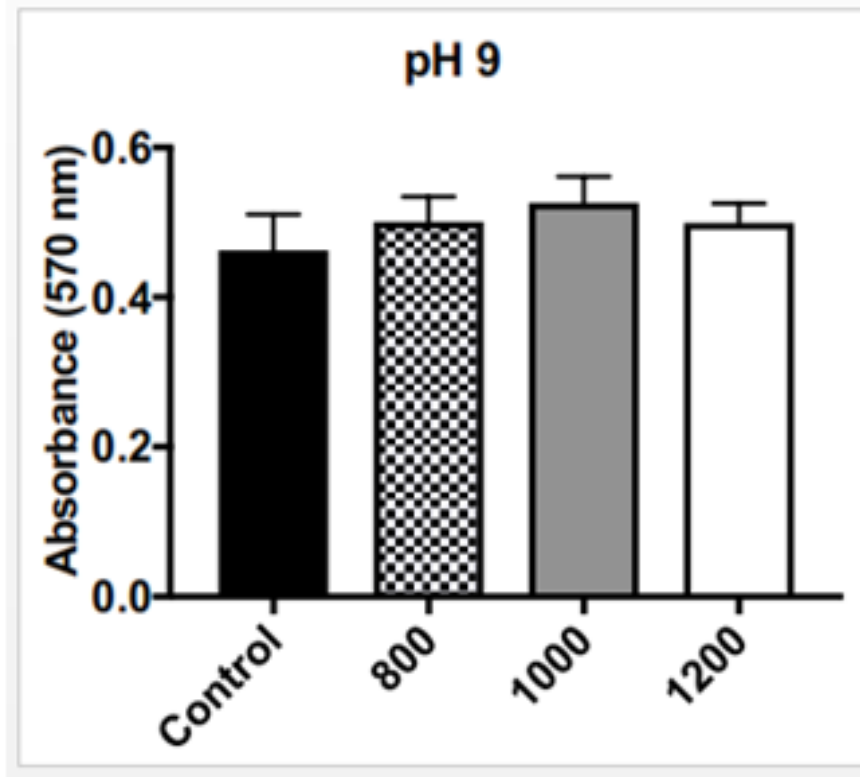


Figura III.11. Resultados estadísticos del ensayo MTT para muestras de HA con pH=9 con diferentes temperaturas de sinterización.

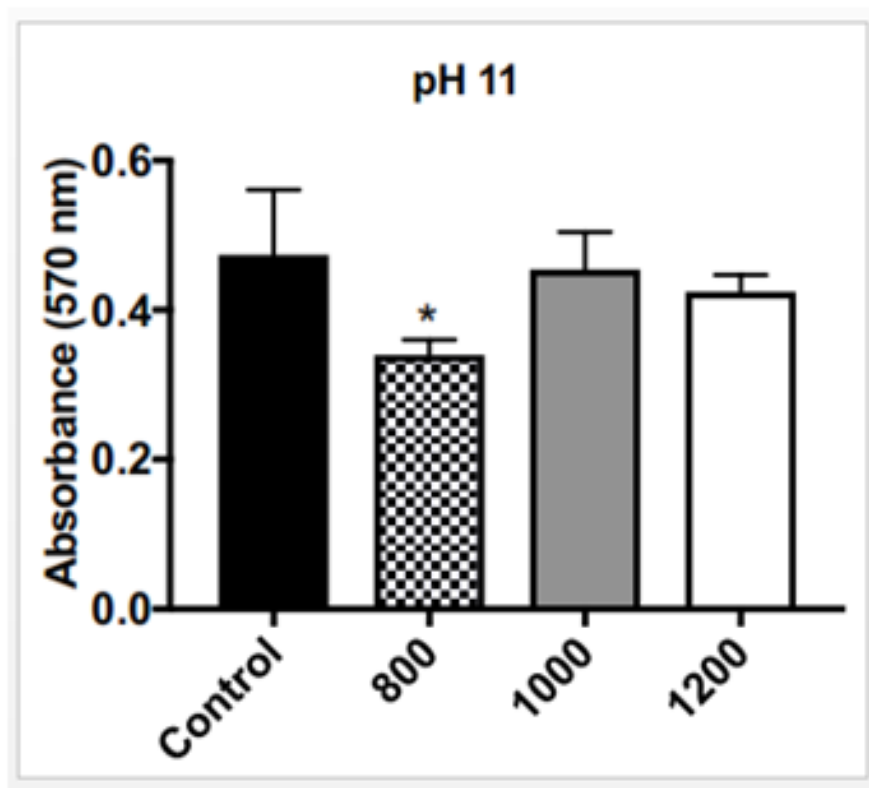


Figura III.12. Resultados estadísticos del ensayo MTT para muestras de HA con pH=11 con diferentes temperaturas de sinterización.

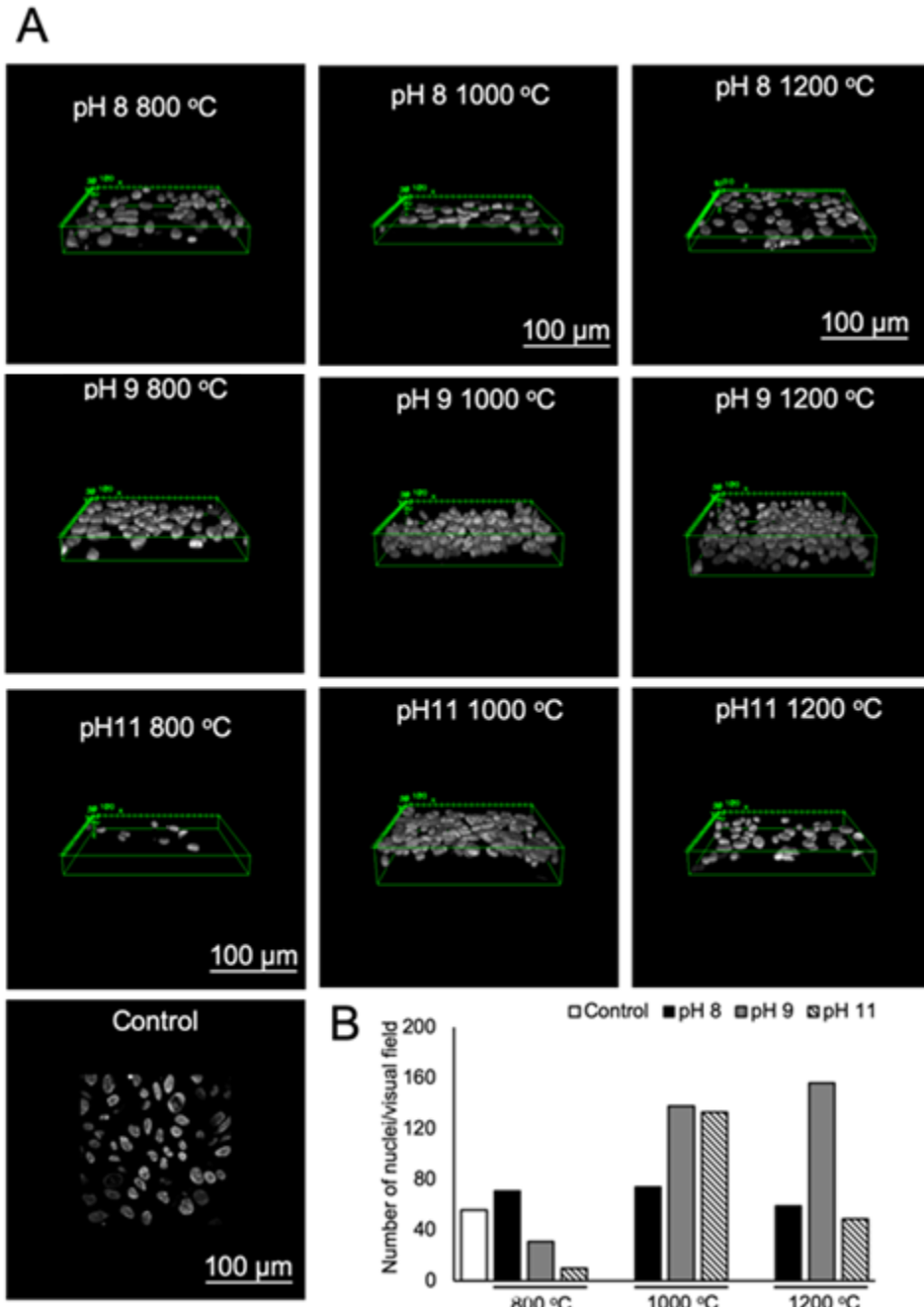


Figura III.13. Los osteoblastos SaoS-2 crecen de manera diferencial en las tabletas de HA que forman capas. (A) Células teñidas con Hoechst 33342 para la visualización de núcleos. Vista 3D de osteoblastos SaoS-2 cultivados en tabletas con pH 8 (800, 1000, 1200 °C), pH 9 (800, 1000, 1200 °C), pH11 (800, 1000, 1200 °C). (B) Cuantificación con el software Fiji del número de células osteoblasticas teñidas con Hoecht 33342.

CAPITULO IV. PREPARACIÓN DE HIDROXIAPATITA POR EL MÉTODO DE MECANOSÍNTESIS.

IV.1. Mecanosíntesis de hidroxiapatita dopada con iones de hierro

Existen estudios únicos que demuestran que la incorporación de hierro en la estructura de HA cambia su reactividad, reduce la temperatura de la fase de sinterización activa [11], aumenta la capacidad de adsorción de un material a factores de crecimiento, aumenta la actividad celular proliferativa y de adsorción [12]. Sin embargo, un análisis moderno detallado muestra la ausencia de datos sistemáticos sobre la influencia de la naturaleza de las sustituciones iónicas y las relaciones de concentración sobre las características de los productos de síntesis y las características tecnológicas de los materiales.

Para la obtención de nanopulvos compuestos de muestra de hidroxiapatita-ferrita dentro de este proyecto, se utilizaron dos métodos. El método 1 es el método denominado mecano-síntesis y el método 2 es el método denominado mecanoactivación, los cuales se llevaron a cabo en un molino planetario con el uso de tambores de acero y cuerpos de fresado.

Para la preparación del polvo por el método 1, los reactivos iniciales son CaO y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ los cuales se calcularon y se mezclaron en cantidades 1 y 0,6 mol, para la relación Ca: P = 1,67 en un molino planetario durante 30 minutos. Después de mezclar, se agregaron 300 ml de agua a la mezcla para homogenizar, y se continuó la síntesis en el molino planetario durante 2, 5 y 7 horas a $v = 400$ rpm. Además, la suspensión se filtró y se secó a 95°C para completar el secado. En este trabajo, se utilizaron reactivos analíticamente puros producidos por Merck & Co.

Para el método 2, el polvo de hidroxiapatita se obtuvo inicialmente por deposición a partir de soluciones. La síntesis de hidroxiapatita por deposición a partir de soluciones acuosas se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente reacción:



Se vertió una solución de nitrato de calcio ($0.5 \text{ M Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en un recipiente de reacción y, bajo agitación continua, solución de hidrofosfato de amonio ($0.5 \text{ M.} (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) (pureza $\geq 98\%$) Se fue añadiendo poco a poco. Se realizó la síntesis a pH de la solución de $9,0 \pm 0,2$, que se mantuvo mediante la adición de NH_4OH en la reacción. La suspensión obtenida se mantuvo en aire durante dos días, después de lo cual el depósito se separó por filtración y luego se lavó con etanol con posterior filtración y secado a 95°C . Después de la deposición, lavado y secado de los productos de interacción, el polvo se trató en el molino de bolas durante 2, 5 y 7 h en agua desionizada a $v = 400 \text{ rpm}$. La pureza de los reactivos utilizados superó el 98%. Después de la síntesis o el tratamiento mecánico, los polvos se sometieron a un tratamiento de térmico a 1000°C durante 2 h.

Las muestras se investigaron mediante el método de difracción de rayos X (DRX) en radiación Cu K_α (difractómetro Siemens D-500). Se realizó un estudio de espectroscopia IR con un espectrómetro Fourier FSM 1202. Se realizó una investigación de resonancia paramagnética electrónica (EPR) en un espectrómetro EPR (Jeol JES TE-300, Tokio, Japón), operado en modo de banda X a una frecuencia de modulación de 100 kHz, a temperatura ambiente. Se realizó el estudio de microscopía electrónica y un microanálisis de sonda electrónica con un microscopio electrónico de barrido tipo LEO 1450 VP.

IV.2. Investigación de las propiedades de hidroxiapatita

IV.2.1. Resultados por el método de difracción de rayos X

La investigación de DRX mostró que, durante el tratamiento mecánico para $t_{\text{tr.}} = 2 \text{ h}$, se forman polvos con fases amorfas (Figura IV.1 a, a'). Sin embargo, después del tratamiento para $t_{\text{tr.}} > 2 \text{ h}$, se registra una fase de hidroxiapatita, es decir, se produce una mecanosíntesis (Figura IV.1 b, b', c, c'). Los picos de los rayos X amplios son típicos de los nanopolvos de hidroxiapatita [26], [27], [28], [29]. Los picos de difracción observados a $2\Theta \sim (31.7-31.9)^\circ$ después de la síntesis mecánica para 5 y 7, son una suma de líneas ampliadas HA y

TCP. Dependiendo del contenido de estas fases y su defecto (que afecta el ancho de los picos

respectivos) se observa un desplazamiento del pico superpuesto y una modificación de su forma (ver Figura IV.1 b', c').

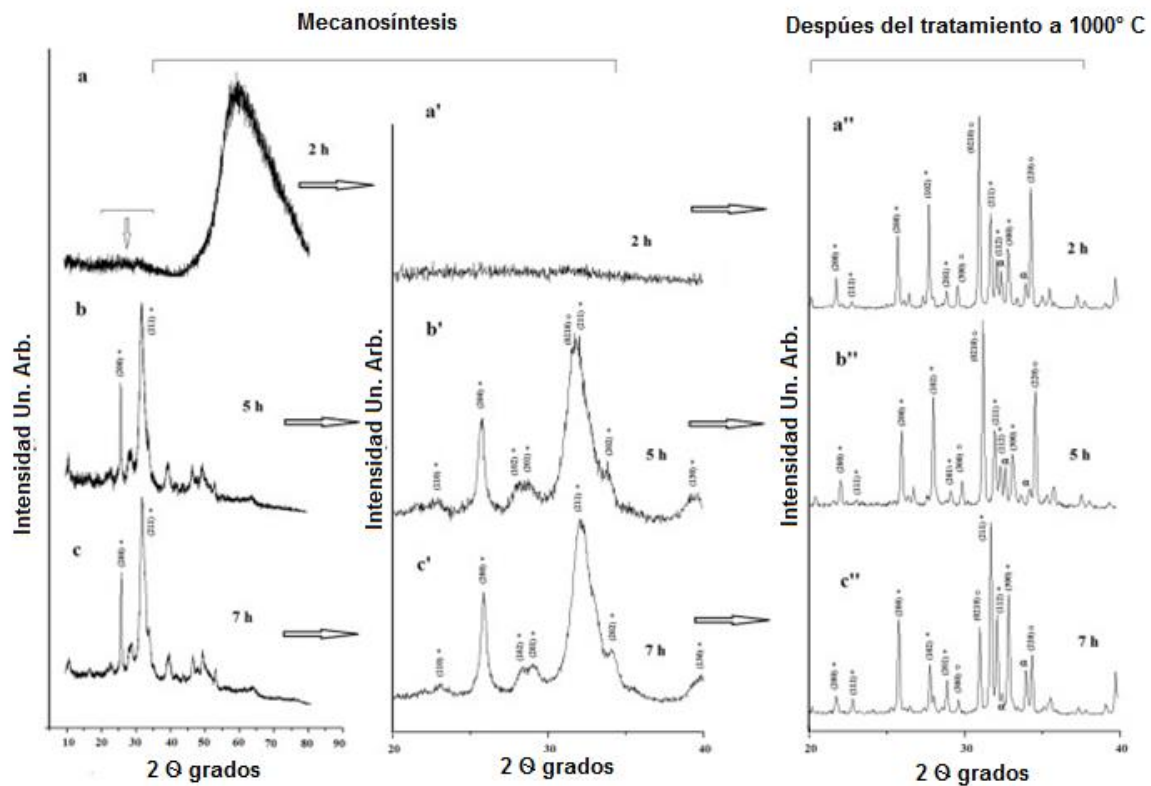


Figura IV.1. Fragmentos de patrones de DRX para polvos obtenidos por mecano-síntesis y sometidos a un tratamiento de térmico a 1000 ° C. (*) denota la fase $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, (o) denota la fase $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, (α) denota la $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Los polvos fueron sometidos posteriormente a un tratamiento térmico de 1000 ° C el cual intensifica el proceso de cristalización de HA. Este fenómeno se puede observar en los patrones de DRX que los polvos consisten de dos fases: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (o TCP) (ver Fig. 1 a'' - c'') [30], [31], [32], [33], [34]. Con el aumento del

tiempo en la mecosíntesis, disminuye el contenido de la fase $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y aumenta el contenido de HA (Figura IV.2). Esta transición inversa de HA, a saber, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \rightarrow \text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, se puede llevar a cabo en el caso de un exceso de vapor de agua en la atmósfera en la que se realiza el calentamiento de las muestras [3] .

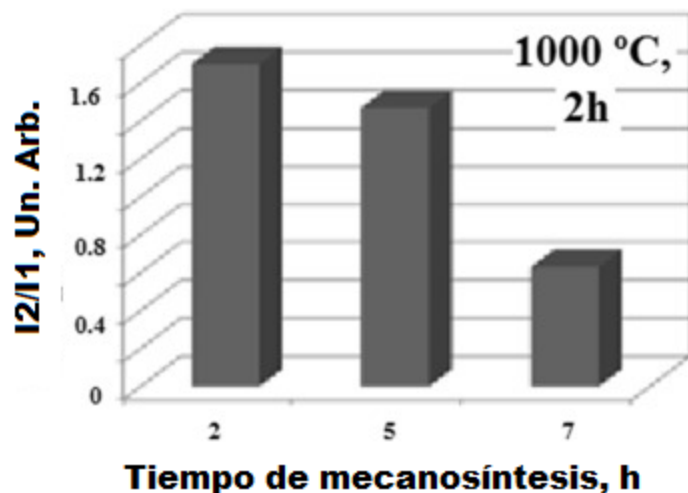


Figura IV.2. Relación en las intensidades máximas en función del tiempo de mecosíntesis después del tratamiento con temperatura en $T_{tr.} = 1000^\circ \text{C}$. I_1 es la intensidad de la línea (002) de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. I_2 es la intensidad de la línea (220) de $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Los datos obtenidos confirman que la relación HA/TCP se puede controlar variando el tiempo de mecosíntesis, el régimen de tratamiento de temperatura posterior y la humedad del entorno de calcinación .

Los datos de espectroscopía IR revelan que los polvos sintetizados contienen $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y pequeñas cantidades de agua y productos de absorción (Figura IV.3 a, a '). Sin embargo, después de la calcinación, la banda de absorción de agua que se encuentra en la muestra desaparece (Figura IV .3 b). En la banda de absorción de HA a $\nu \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$, se registran picos / hombros a $\nu \sim 1124, 974$ y 947 cm^{-1} , que indican la presencia de $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [31], [35], [36], [37], [38]. Las características específicas de los polvos calcinados es el registro de la $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ de fase en la banda de absorción a

$\nu \sim 600 \text{ cm}^{-1}$ y la aparición de una banda OH^- en los polvos obtenidos por mecano-síntesis durante 7 h (ver Fig. IV.3 b'). Además, se observa un estrechamiento de la banda de absorción a $\nu \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ y un debilitamiento sustancial de la intensidad de los picos / hombros atribuidos a $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, mientras que la intensidad de la banda de absorción de HA en $\nu \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ aumenta ligeramente (ver Fig. IV.4). Estos cambios en los espectros de absorción de IR indican las siguientes transformaciones: $\beta\text{-},\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ [3], [39], [40], que concuerda con los resultados de XRD (ver Fig. IV.2).

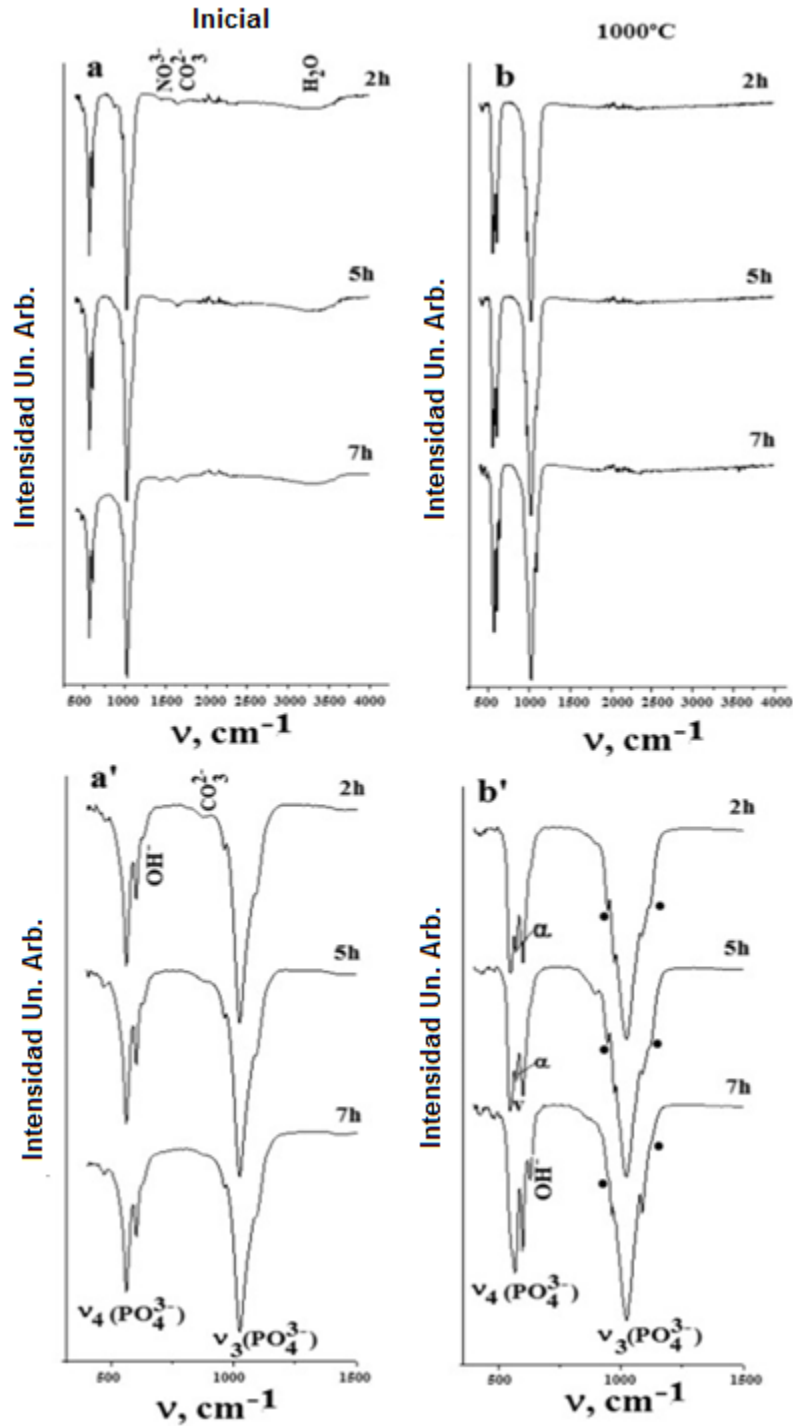


Figura IV.3. Fragmentos de espectros de absorción IR de polvos obtenidos por mecano-síntesis (a, a') y tratamiento posterior a la temperatura a 1000 °C durante 2 h (b, b'). En (b'), la fase β -TCP se denota por (•), y α -TCP se denota por (α).

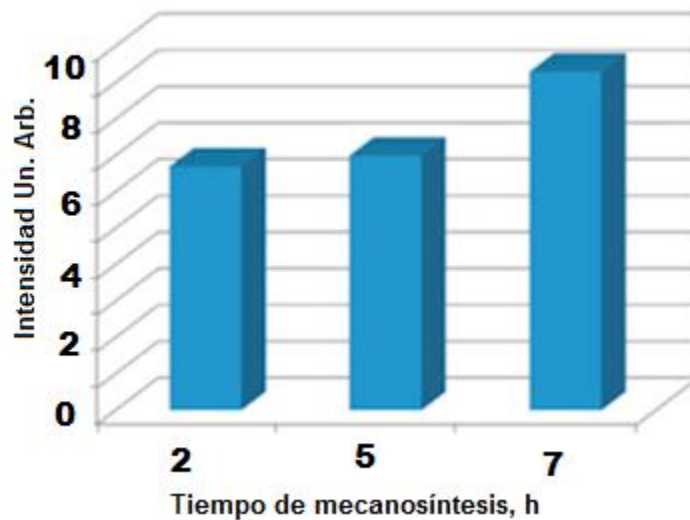


Figura IV.4. Cambio en la intensidad de la banda de absorción a $\nu \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ de polvos sometidos a mecosíntesis para diferentes tiempos y tratamientos térmicos a $1000 \text{ }^\circ\text{C}$.

IV.2.2. Resultados por el método de resonancia paramagnética (EPR)

En los polvos sintetizados, se registran las señales EPR 1 y 2 (Fig. IV.5 a, Tabla IV.1) con factores de $g \sim 2$ y 4.2 , respectivamente. La señal 2 se atribuye a los iones Fe^{3+} en el entorno de baja simetría. La causa de la aparición de la señal con $g \sim 4.2$ puede ser la acumulación de aglomerados muy pequeños que contienen iones férricos e iones Fe^{3+} , que sustituyen a los iones Ca^{2+} en la estructura de HA. La señal 1 con $g \sim 2$ se atribuye a las partículas superparamagnéticas distribuidas en HA con fuertes interacciones dipolares [41], [42], [43], [44], [45], [46], [47], [48], [49], [50]. Las señales 1 y 2 están ubicadas en una línea amplia atribuida a la resonancia magnética electrónica (RME), que surge debido a la presencia de nanopartículas de hierro y nanopartículas de óxidos de hierro, que revelan un superparamagnetismo [51], [52], [53], [54]. Como se ve en la Figura IV.6 a, las intensidades de las señales 1 y 2 aumentan con el aumento del tiempo de mecosíntesis. Esto indica que, durante el tratamiento mecánico, el hierro de desgaste por

fricción en las herramientas de fresado (paredes y bolas de tambor) penetran en el producto sintetizado y una parte de este hierro se incorpora a la estructura de hidroxiapatita.

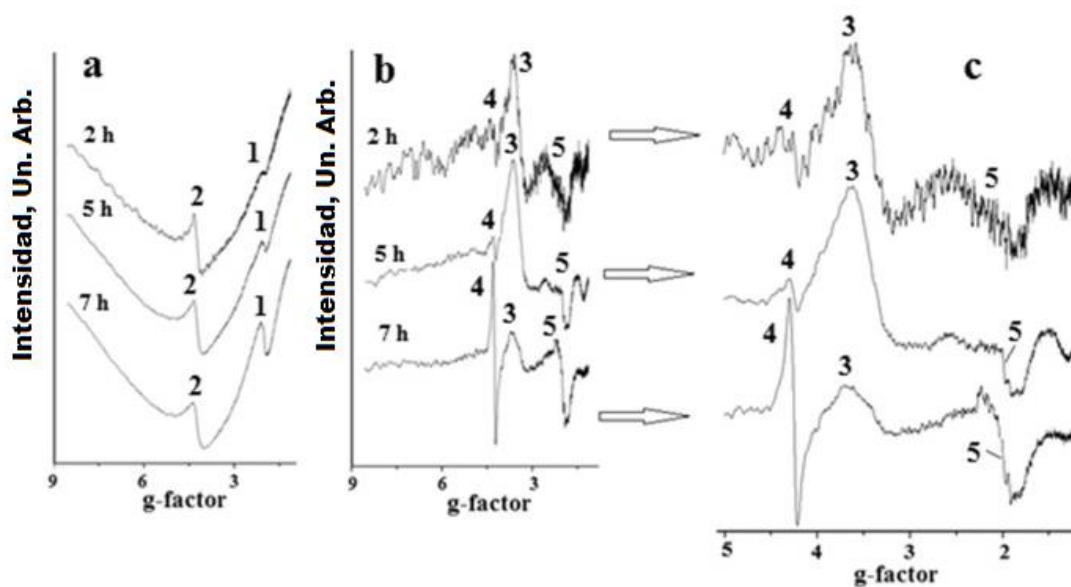


Figura IV.5. Espectros de resonancia obtenidos en polvos sintetizados (a) y después de su calcinación a 1000 ° C durante 2 h (b, c).

Tabla IV.1. Los valores de g-factores de las señales de resonancia en los polvos sintetizados y recocidos.

Tiempo de molido, h	factor g	
	Polvo sintetizado	Después de $T_{tr.} = 1000 \text{ } ^\circ \text{C}, 2 \text{ h}$
2	$g_1 = 1,98; g_2 = 4.2$	$g_4 = 4,26; g_3 = 3,34; g_5 = 2.07$
5	$g_1 = 1,98; g_2 = 4.2$	$g_4 = 4,25; g_3 = 3,4; g_5 = 2.00$
7	$g_1 = 1,98; g_2 = 4.2$	$g_4 = 4,26; g_3 = 3,4; g_5 = 2.00$

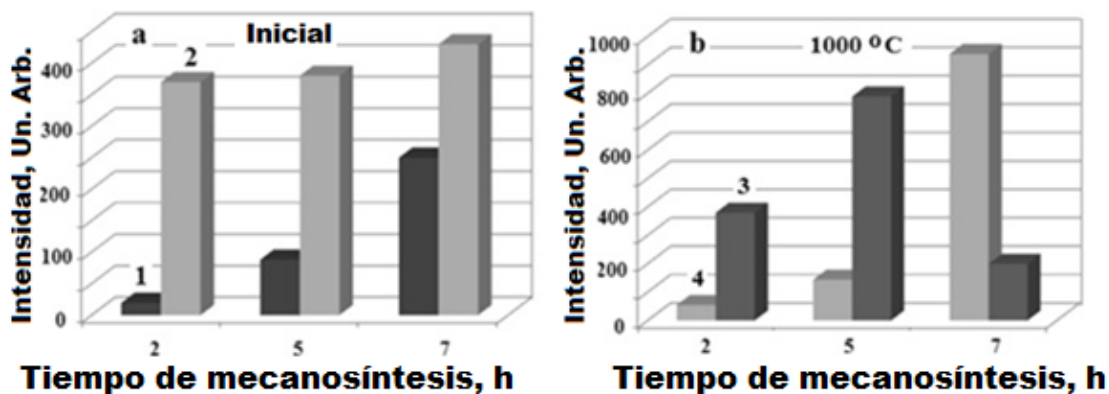


Figura IV.6. Cambio en la intensidad de las señales de resonancia en polvos sintetizados (a) y después de su tratamiento térmico a 1000 ° C (b) con el tiempo de mecano-síntesis: (a) señales con $g \sim 2$ (1) y $g \sim 4.2$ (2); (b) señales con $g \sim 3.34$ (3) y $g \sim 4.26$ (4).

La calcinación de los polvos obtenidos se acompaña de un cambio sustancial en la forma de los espectros EPR (ver Figura IV.5 b, c). Junto con las líneas de resonancia, en la región de $g \sim 2$, se registran señales con $g \sim 4.3$ y $g \sim 3.3$ (ver Tabla IV.1). Tanto la aparición de estas señales como el cambio en su intensidad indican la participación de los iones Fe^{3+} en la formación de diferentes fases de ferrita [55], [56], [57], [58]. Por ejemplo, según [58] la señal con $g \sim 3.3$ puede atribuirse a los iones Fe^{3+} distribuidos en sitios de coordinación octaédricos en $Fe_{1-x}Ca_xFe_2O_4$. Después de la mecano-síntesis durante 5 h, el contenido de esta fase aumenta (Figura IV.6 b). Sin embargo, a un mayor tiempo de mecano-síntesis, se observa una disminución en la intensidad de la señal con $g \sim 3.3$ y un aumento en la intensidad de la línea con $g \sim 4.3$. Dichos cambios pueden asociarse con una disminución en el valor de x en $Fe_{1-x}Ca_xFe_2O_4$ [58], [59], con la transformación de esta fase en la fase Fe_3O_4 y con la sustitución parcial $Fe^{3+} \rightarrow Ca^{2+}$ en la HA, acompañado por la compensación de carga y la distorsión de simetría de hidroxiapatita. En el intervalo de 300 a 400 mT, se registran una línea con $g \sim 2$ y un ancho (ΔB) ~ 60 mT y una cantidad de señales muy débiles ubicadas en él. La línea ancha se atribuye a partículas superparamagnéticas grandes, y la señal estrecha con $g \sim 2$ se asocia con partículas superparamagnéticas pequeñas [43], [54]. Sin embargo, la presencia de seis líneas con una distancia de ~ 8.3 mT entre ellas en lugar de una línea indica la incorporación de iones Mn^{2+} en la red de HA. Este valor está cerca de la constante de la estructura superfina de los iones Mn^{2+} en HA ($A = 8.5$ mT) [60], [61]. Los iones Mn^{2+} pueden

penetrar en HA a partir de los residuos de desgaste del acero del tambor y las bolas, que contienen manganeso .

Por lo tanto, se estableció mediante el método EPR que la mecano-síntesis de HA en tambores de acero con bolas de acero se acompaña de la formación de residuos de desgaste de acero de las herramientas de molienda, oxidación de hierro y formación de nanopartículas superparamagnéticas de ferrita de composición simple y compleja, lo que finalmente conduce a la síntesis del polvo compuesto HA-ferrita. Al mismo tiempo, los iones Fe^{3+} y Mn^{2+} entran en la estructura de HA, lo que conduce a distorsiones de la red cristalina de HA.

IV.2.3. Resultados por el método de microscopia de barrido electrónico

La investigación SEM mostró que el polvo sintetizado es una aglomeración de agregados de diferentes tamaños que fueron calculados y que alcanzan desde 22-1 μm , lo cual se encuentra dentro de los rangos de nanopartículas (Fig. IV.7 a, b). De acuerdo con los datos obtenidos de microanálisis, en el polvo sintetizado, se registran elementos que son característicos de la hidroxiapatita con un contenido muy bajo de hierro, que se penetró en el polvo en forma de residuos de las herramientas de fresado durante la mecano-síntesis (Fig. IV.6c). Además, en el polvo, se detecta un mayor contenido de oxígeno. Se puede suponer que esto se debe a la presencia de humedad en las muestras y en el medio ambiente. Después del tratamiento en $T_{\text{tr.}} = 1000^\circ \text{C}$, se observa la formación de un material cerámico poroso (Fig. IV.7a', b'). Tenga en cuenta que, para HA, $T_{\text{desintegración.}} = 1650^\circ \text{C}$, y $T_{\text{sint.}} = 2/3 T_{\text{fundido.}} = 1100^\circ \text{C}$. Es por esto que el material sinterizado tiene una gran porosidad. El contenido de los elementos en estas muestras corresponde al de HA.

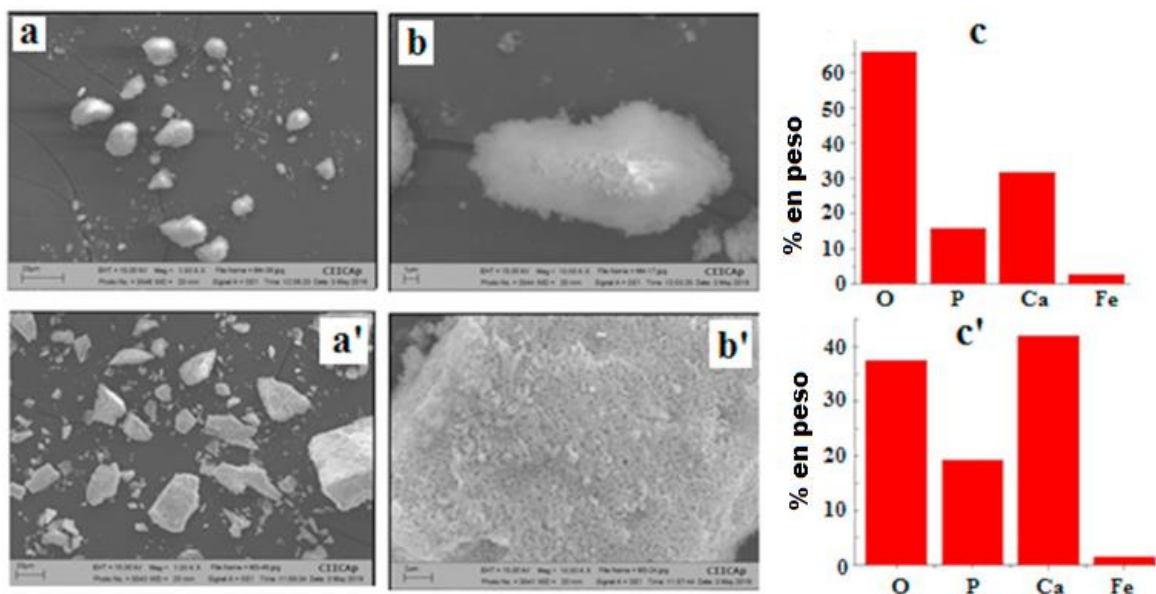


Figura IV.7. Micrografías de partículas de polvo de hidroxiapatita obtenidas por mecano-síntesis durante 7 h (a, b) y después del tratamiento de temperatura a 1000 ° C (a', b'). En (c, c'), se presentan los contenidos de los elementos en aglomerados.

IV.3. Mecanoactivación de hidroxiapatita.

IV.3.1. Resultados por el método de difracción de rayos X

Se realizó una comparación de los patrones de DRX en los polvos obtenidos por mecano-síntesis (Figura IV.8 a, a') y se sometió a mecanoactivación (Figura IV.8 b, b') muestra que se caracterizan por picos anchos típicos de sistemas nanodispersos.

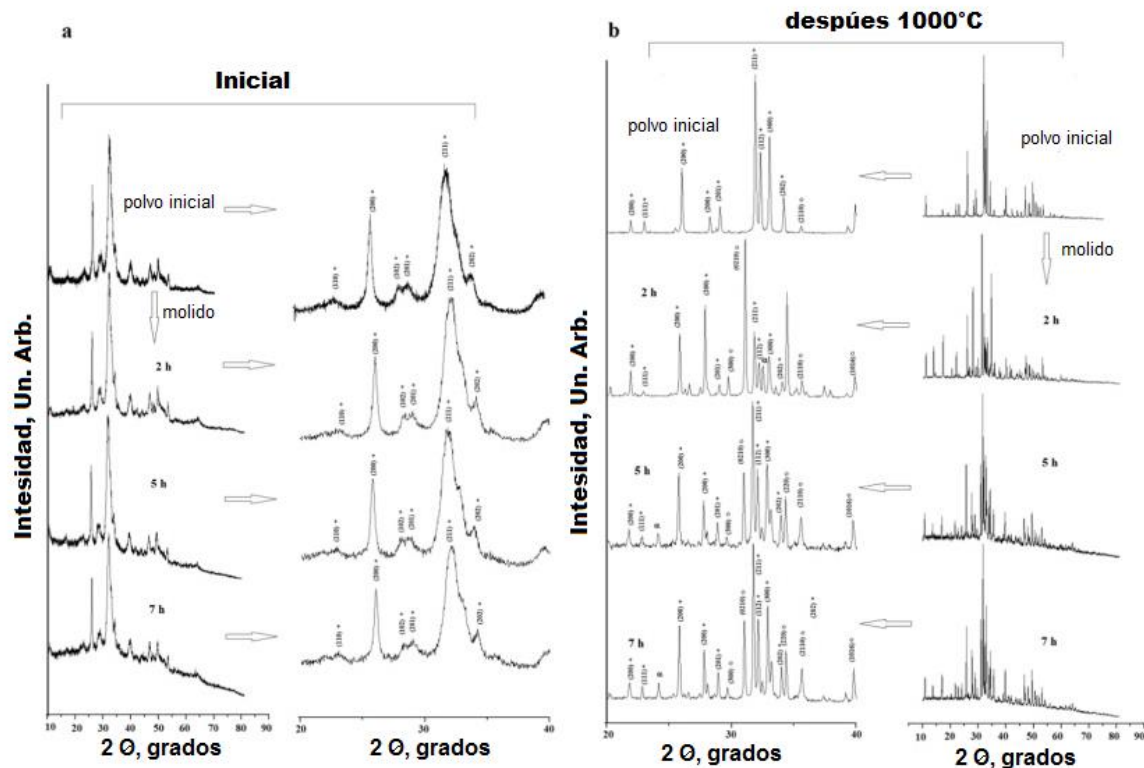


Figura IV.8. Fragmentos de patrones DRX de polvos obtenidos por mecanoactivación (a) y después del tratamiento de temperatura a 1000 ° C (b). (*) Indica la fase $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, (o) indica la fase $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. El polvo inicial se obtuvo a $\text{pH} = 9$.

Como en el caso de la mecano-síntesis, después del tratamiento térmico a 1000 ° C, la fase TCP aparece después del tratamiento durante 2 h en el molino de bolas. Los contenidos de HA y TCP cambian a medida que aumenta el tiempo de tratamiento (Fig. 8 b). El carácter de cambio en el contenido de la fase TCP indica que, durante la molienda durante 2 h, el proceso $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \rightarrow \beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ domina inicialmente, mientras que a medida que la molienda el tiempo aumenta a $t_{\text{mol.}} > 2 \text{ h}$, ocurre el proceso inverso $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Se producen transformaciones de fase similares en muestras tratadas térmicamente obtenidas por mecano-síntesis (ver Fig. IV.9 a " - c "). Esto demuestra la similitud de los procesos de mecano-síntesis y mecano-activación.

Un análisis de los espectros de absorción IR de los polvos mecano-activados no reveló diferencias sustanciales entre ellos y los espectros de los polvos mecano-sintetizados (ver Fig. IV.3 y Fig. IV.9). Cabe señalar que, durante la mecano-activación, la transición

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ocurre más intensamente que durante la mecosíntesis. Por ejemplo, después de moler para $t_{\text{mol.}} \geq 5$ h, las bandas de absorción de TCP desaparecen y se registra el estrechamiento de la banda de absorción de HA. En vista del hecho, en difracción de rayos X los patrones de estos polvos, TCP se identifica, se puede concluir que, durante el tratamiento mecánico, las transformaciones de fase ocurren predominantemente en la capa superficial de las nanopartículas.

IV.3.2. Resultados por el método de Infra Rojo

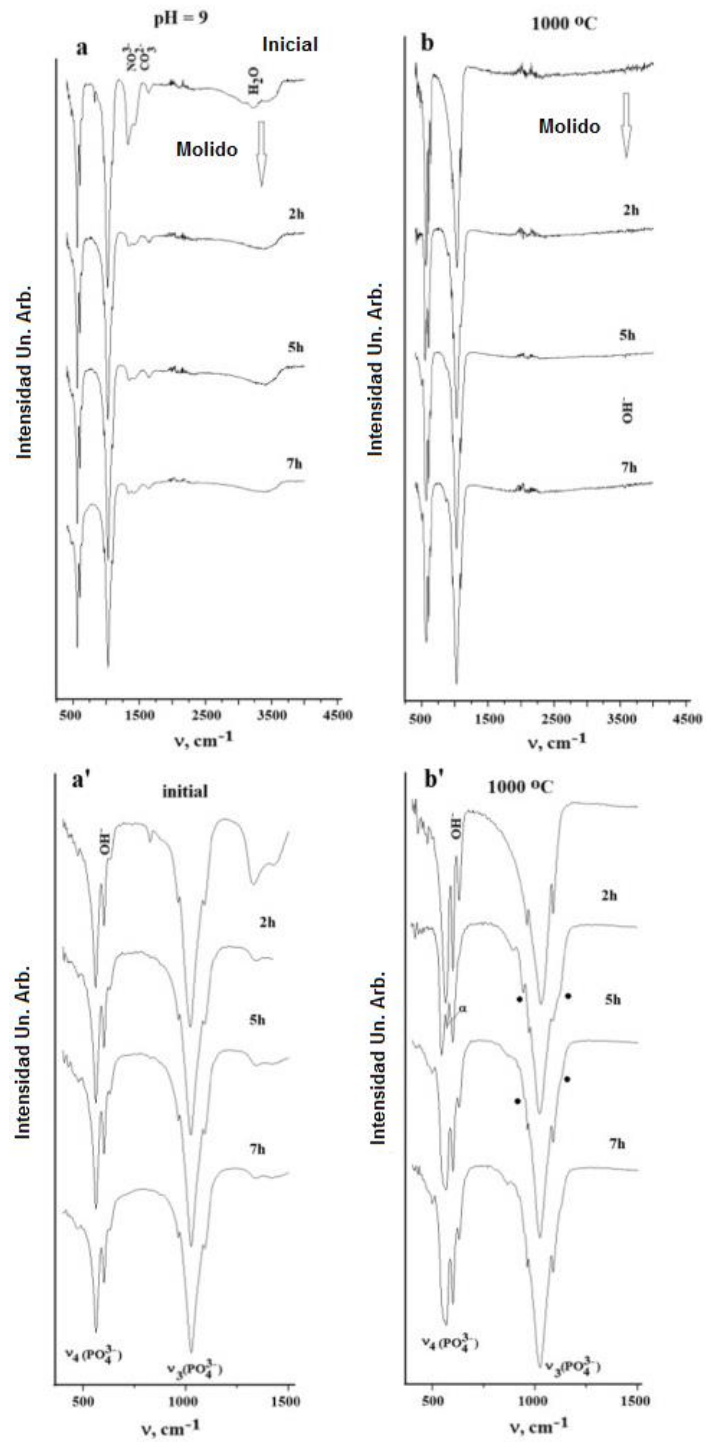


Figura IV.9. Fragmentos de espectros de absorción IR de polvos obtenidos por mecanoactivación (a, a') y después de su tratamiento térmico a 1000 °C durante 2 h (b, b'). En (b'), la fase β -TCP se denota por (•), y la fase α -TCP se denota por (v).

IV.3.3. Resultados por el método de resonancia paramagnética (EPR)

Como en los polvos mecano sintetizados, Así en los polvos obtenidos por deposición a $\text{pH} = 9.5 \pm 0.2$ y sometidos a mecanoactivación, las señales EPR 1 y 2 (Fig. IV.10 a, Fig. IV 5a) con factores g de ~ 2 y 4.2 , respectivamente, están registrados continuamente. La diferencia entre las dos señales obtenidas es que la señal 2 con $g \sim 4.2$, es atribuida predominantemente a los iones Fe^{3+} que se encuentran formando parte de los agregados es sustancialmente más débil que la señal 1 con $g \sim 2$. La formación de la señal intensamente amplia 1 después del fresado para $t_{\text{mol.}} = 5$ h, a su vez, indica un aumento en el número de partículas superparamagnéticas en el polvo tratado, y su posterior debilitamiento puede estar relacionado con el desarrollo de procesos de oxidación de partículas y la penetración de una parte de iones Fe^{3+} en HA.

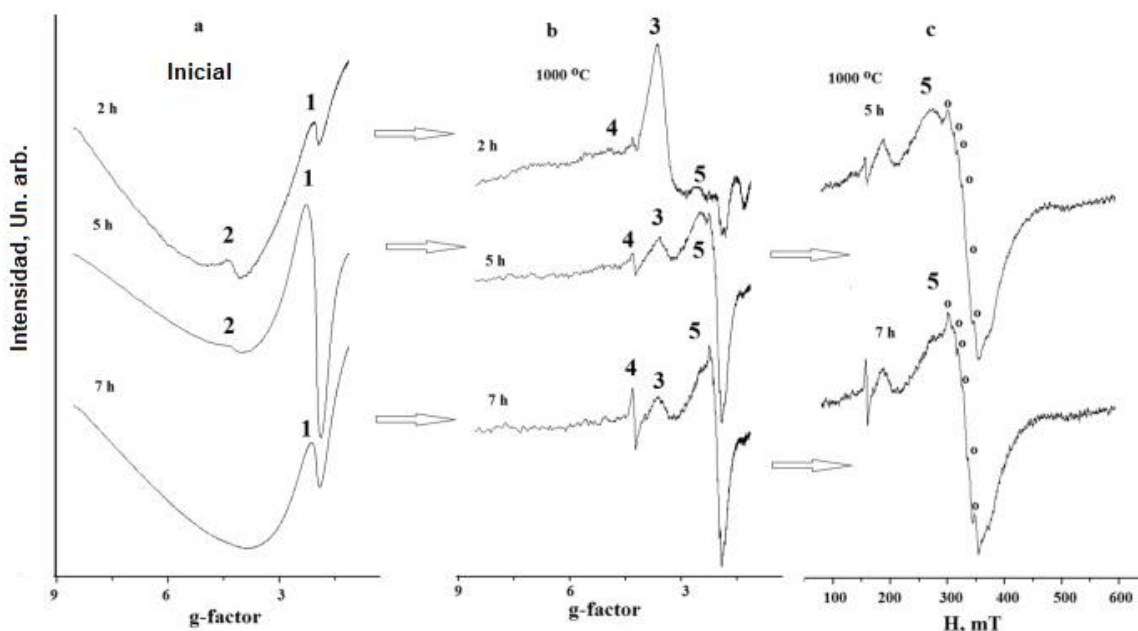


Figura IV.10. Espectros de resonancia obtenidos en polvos de HA sometidos a tratamiento mecánico (a) y después de su calcinación a $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 h (b, c). En (c), las líneas de la estructura hiperfina de los iones Mn^{2+} en HA se indican con o.

Después de la calcinación, la forma de los espectros cambia (ver Fig. IV.10 b). Líneas de resonancia con $g \sim 2$; $g \sim 3.3$, y $g \sim 4.2$ están registrados en ellos. Las intensidades de estas

señales dependen del régimen de activación (Fig. IV.11). Por ejemplo, el aumento en la intensidad de la señal con $g \sim 4.2$ indica un aumento en el número de iones Fe^{3+} debido a un aumento en el número de inclusiones de ferrita, la sustitución $Fe^{3+} \rightarrow Ca^{2+}$ en HA, y La distorsión de la red de HA, que acompaña este proceso. La señal con $g \sim 3.3$ se atribuye a los iones Fe^{3+} distribuidos en sitios de coordinación octaédricos en $Fe_{1-x}Ca_xFe_2O_4$. Una disminución en su intensidad es causada por la transformación $Fe_{1-x}Ca_xFe_2O_4 \rightarrow Fe_3O_4$, que influye en el aumento de la intensidad de la señal con $g \sim 4.3$. El cambio en la intensidad de la línea ancha con $g \sim 2$, que se atribuye a partículas superparamagnéticas grandes, puede asociarse con la fractura parcial de agregados supermagnéticos grandes en otras más pequeñas. Esto también debe llevar a un aumento en la intensidad de la señal con $g \sim 4.3$. El registro de seis líneas con una distancia entre ellas de $\sim 8.3 \pm 0.2$ mT en la línea con $g \sim 2$ indica la incorporación de Mn^{2+} Los iones en la red de HA con una constante de la estructura superfina $A = 8.5$ mT. Cabe señalar que la manifestación más pronunciada de la estructura superfina de Mn^{2+} indica que, durante la mecanosíntesis, menos del 0,05 % en peso de Mn penetra en la HA de los residuos de desgaste de las herramientas de fresado [62] .

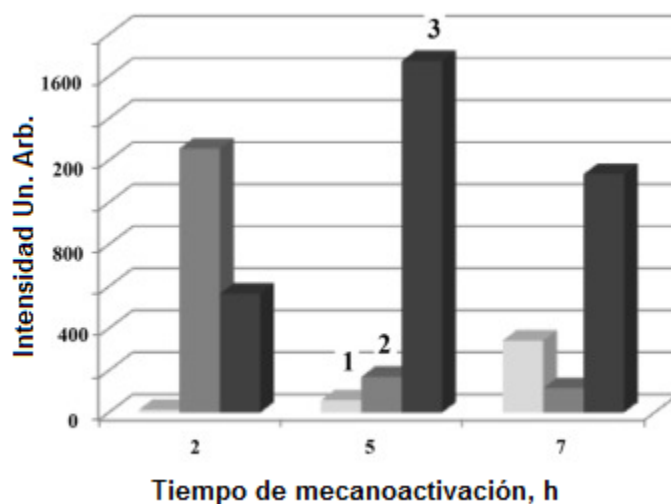


Figura IV.11. Cambio en la intensidad de la señal de resonancia en polvos sintetizados (a) y después del tratamiento térmico a $1000^\circ C$ (b) con el tiempo de mecanosíntesis. (1) Señal con $g \sim 4.2$ (1), (2) señal con $g \sim 3.4$ (2), (3) señal con $g \sim 3.3$.

Las investigaciones de SEM revelaron que el tratamiento mecánico de los agregados de polvo inicialmente sueltos se acompaña de su densificación, y el tratamiento posterior de la temperatura conduce a la sinterización de los agregados con una estructura porosa bien definida (ver Fig. IV.12).

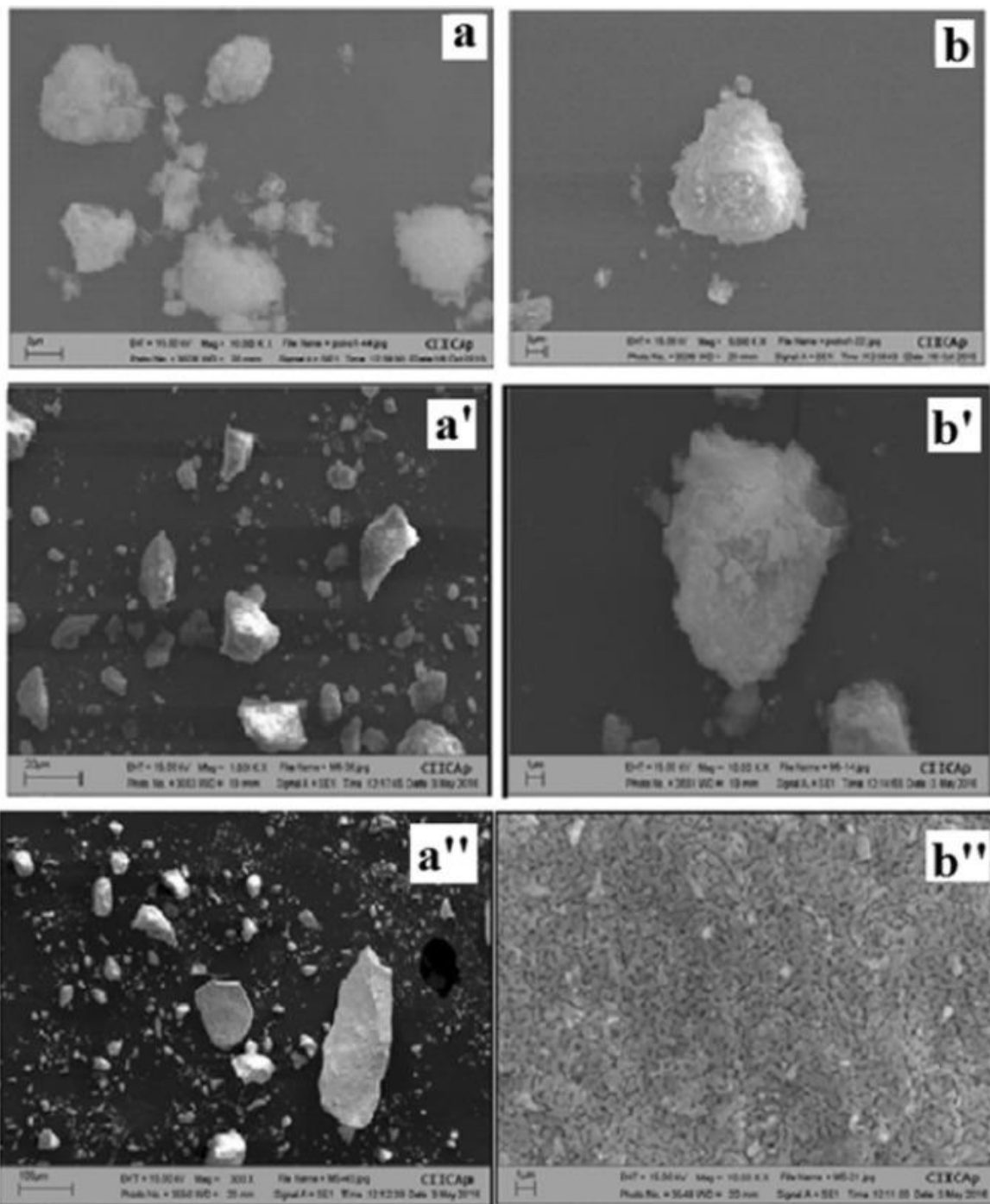


Figura IV.12. Imágenes SEM de agregados de hidroxiapatita obtenidos por el método de precipitación a pH = 9 (a, b), después de la mecanoactivación (a', b') y después del tratamiento de temperatura de polvos mecanoactivados a 1000 ° C (a'', b'').

Después de la mecanoactivación, el hierro se encuentra en los polvos. Su contenido aumenta gradualmente a medida que aumenta el tiempo de molienda (Fig. IV.13). Tenga en cuenta que, después de la mecanoactivación de los polvos de HA durante 7 h, la cantidad de hierro "impureza" es igual a la de la mecanoactivación durante 7 h (~ 5 % en peso), y se encuentra en dos estados en forma de agregados ferromagnéticos en el polvo y en la superficie de HA.

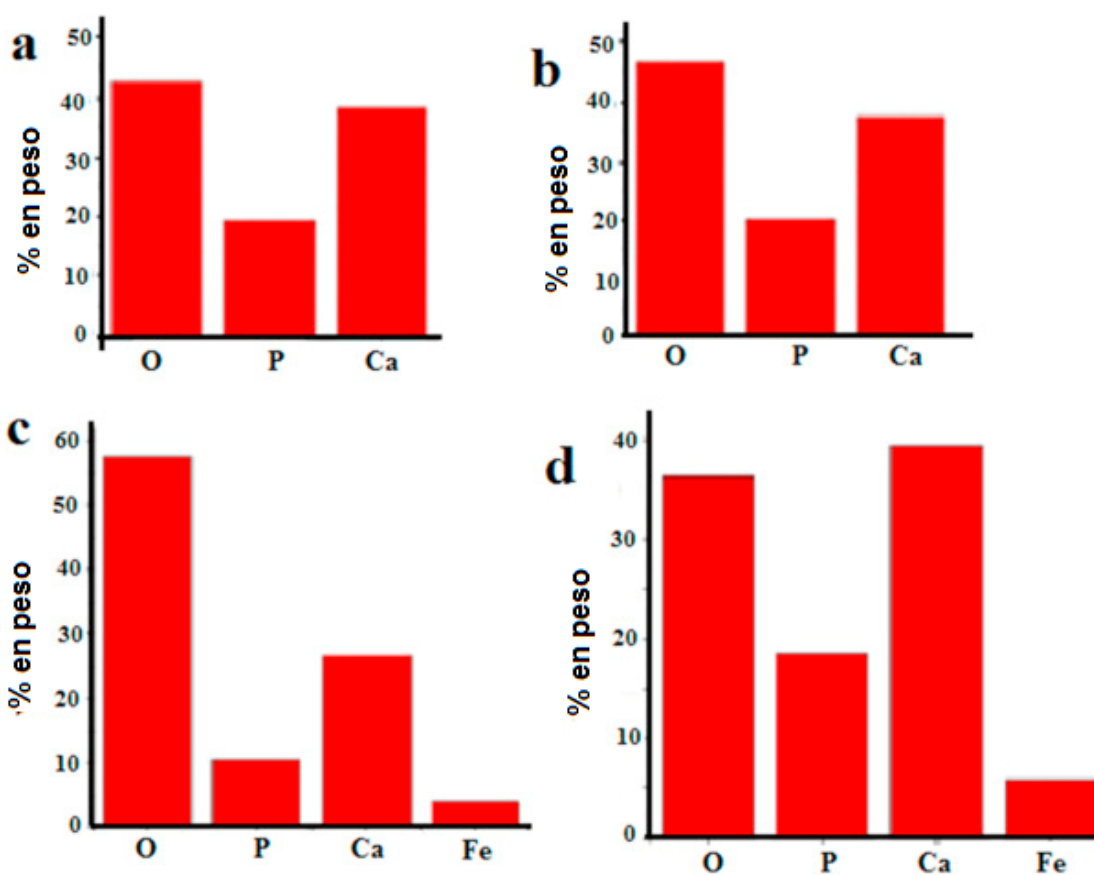


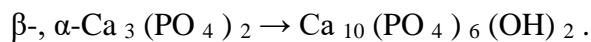
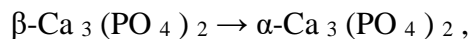
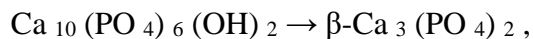
Figura IV.13. Contenidos de elementos en polvo. (a) polvo inicial; (b) polvo después de $T_{tr} = 1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ para $t_{tr} = 2\text{ h}$; (c) polvo después de la mecanoactivación durante 2 h y $T_{tr} = 1000\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{tr} = 2\text{ h}$; (d) polvo después de la mecanoactivación durante 7 h y $T_{tr} = 1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ para $t_{tr} = 2\text{ h}$.

CAPITULO V. CONCLUSIONES

Se concluyó que para el caso de la síntesis de hidroxiapatita por el método de deposición química con diferentes parámetros; Los estudios han demostrado que:

- Para obtener un polvo monofásico de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ las soluciones iniciales se debe utilizar con un valor de $\text{pH} = 9-11$.
- Con el tratamiento térmico de los polvos de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ se inicia el colapso parcial y formación de una $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.
- El grado de transición $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \rightarrow \beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \rightarrow \alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ depende del pH de las soluciones iniciales, la temperatura y el tiempo del tratamiento posterior del polvo.
- El tamaño de los cristalitas (regiones dispersión coherente) como se muestra en la etapa de preparación de polvo y el tratamiento térmico posterior depende del pH , y temperatura de post-tratamiento: para los polvos obtenidos con $\text{pH} = 9$ a 11 , que aumenta el tamaño de cristalitas con el aumento de temperatura de calcinación.
- En congruencia con los datos de DRX,IR, en las pruebas in vitro se demostró, la proliferación y confluencia de las células SaoS-2 cultivadas en las diferentes tabletas mostrando mayor afinidad en los rangos de $\text{pH}=9-11$ con temperaturas desde los $800-1000^\circ\text{C}$; además de exhibir que el crecimiento de las mismas no fue solo en monocapa si no que se sugiere un crecimiento multicapa.

Para el caso de la mecanoactivación y mecano síntesis de hidroxiapatita; Los resultados obtenidos mostraron que, durante la mecano síntesis de la mezcla $\text{CaO}-(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ en un medio acuoso, se forma inicialmente un material amorfo, y se forma $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ cristalino solo después de la molienda para $t_{\text{molido}} > 2$ h. El tratamiento de temperatura de los polvos promueve su cristalización y la formación de las fases β y $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Los contenidos de β -, $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ depende del tiempo de mecano síntesis y se acompaña de las siguientes reacciones:



Se producen transformaciones de fase análogas durante el tratamiento mecánico de los polvos de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ en un medio acuoso.

Tanto el proceso de mecanosíntesis como el proceso de mecanizado de hidroxiapatita en tambores de acero con bolas de acero se acompaña de la penetración de residuos de acero (hierro + manganeso) de las herramientas de molienda en polvo de hidroxiapatita. Una parte insignificante de los iones Fe^{3+} y Mn^{2+} de los restos de desgaste del acero de las herramientas de fresado entran en la red de hidroxiapatita y sustituyen a los iones Ca^{2+} . Una gran parte del hierro oxidado forma inclusiones superparamagnéticas distribuidas en el polvo, lo que conduce a la formación del compuesto de hidroxiapatita-ferrita aleado. El grado de aleación de hidroxiapatita por Fe^{3+} y Mn^{2+} . Los iones y el contenido de las inclusiones de ferrita se pueden controlar variando el tiempo de tratamiento del mecánico.

REFERENCIAS

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 1983;65:55–63. [PubMed]

2

Terry L Riss, PhD, Richard A Moravec, BS, Andrew L Niles, MS, Sarah Duellman, PhD, Hélène A Benink, PhD, Tracy J Worzella, MS, and Lisa Minor. .- Cell Viability Assays

Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul.* 1995;5(2):69–84. [PubMed]

3.

Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys.* 1993;303(2):474–82. [PubMed]

4.

Berridge M., Tan A., McCoy K., Wang R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. *Biochemica.* 1996;4:14–19.

5.

Tada H, Shiho O, Kuroshima K, et al. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods.* 1986;93:157–65. [PubMed]

6.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods.* 1989;119:203–210. [PubMed]

7.

Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Meth.* 1986;89:271–277. [PubMed]

8.

Plumb JA, Milroy R, Kaye SB. 1989. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res* 15;49(16):4435-40. [PubMed]

9.- Granulos : <http://www.ipph.purdue.edu/peck/2007/pujara.pdf>

11.- Kramer E., Zilm M. and Wei M. A Comparative Study of the Sintering Behavior of Pure and Iron- Substituted Hydroxyapatite // *Bioceram Dev.* 2013. V.3. P. 1-9.

12.- Sano I.M., Hirakawa M. Surface characteristics determining the cell compatibility of ionically cross-linked alginate gels // *Biomed. Mater.* 2014. V.9. P.1-7.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Jefatura de Posgrado en Ingeniería y Ciencias Aplicadas



"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Morelos, a 10 de octubre de 2019.

DR. ROSENBERG JAVIER ROMERO DOMÍNGUEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN
INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS
P R E S E N T E

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada "SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE BIOCERÁMICOS CON BASE A HIDROXIAPATITA" que presenta la alumna **Ivette Mendoza Torres**, para obtener el título de **Doctorado en Ingeniería y Ciencias Aplicadas** con opción terminal en **Tecnología de Materiales**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
DR. JOSÉ GONZALO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ	Aprobado	
DR. ISAÍ ROSALES CADENA	Aprobado	
DR. MYKOLA KAKAZYEY	Aprobado	
DR. RENE GUARDIÁN TAPIA	Aprobado.	
DR. IVÁN MARTÍNEZ DUNCKER RAMÍREZ (CIDC-UAEM)	Aprobado	
DR. PEDRO ANTONIO MÁRQUEZ AGUILAR	Aprobado	
DRA. MARYNA VLASOVA	Aprobado	

PLAZO PARA LA REVISIÓN 20 DÍAS HÁBILES (A PARTIR DE LA FECHA DE RECEPCIÓN DEL DOCUMENTO)

NOTA. POR CUESTION DE REGLAMENTACIÓN LE SOLICITAMOS NO EXCEDER EL PLAZO SEÑALADO, DE LO CONTRARIO LE AGRADECEMOS SU ATENCIÓN Y NUESTRA INVITACIÓN SERÁ CANCELADA.