



EL SABER DE MIS HIJOS  
HARÁ MI GRANDEZA

# UNIVERSIDAD DE SONORA

---

---

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA  
Y METALURGIA

**“EVALUACION DE LA BIOACTIVIDAD DE  
BIOMATERIALES SINTERIZADOS DE  
HIDROXIAPATITA Y WOLLASTONITA  
NATURAL EN FLUIDOS FISIOLÓGICOS  
SIMULADOS”**

Tesis

Que para obtener el título de:

**INGENIERO METALURGICO**

Presenta

**ECHEVERRIA LOPEZ KIMBERLY GUADALUPE**

Hermosillo, Sonora

Septiembre 2018

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## INDICE DE CONTENIDO

	Página
Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Índice de contenido.....	iii
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tablas.....	viii
Resumen.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Objetivo General.....	5
I.2. Objetivos Particulaes.....	5
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	6
II.1. Biomateriales.....	8
II.2. Hidroxiapatita.....	10
II.2.1. Cristalizacion de la hidroxiapatita 350°C /750°.....	12
II.3. Wollastonita.....	15
II.4. Fluido Fisiológico Simulado.....	19
II.4.1. Diseño de la Solución de Fluido Fisiológico Simulado (SBF).....	20
II.5. Proceso Sol-gel.....	21
II.6. Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM).....	23
II.7. Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).....	23

<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>24</b>
	III.1. Síntesis de Hidroxiapatita Estequiometrica 350°C/750°C....	25
	III.2. Sinterización de los Materiales Hidroxiapatita 350°C/750°C y β Wollastonita.....	28
	III.3. Preparación del Baño Fisiológico Simulado (SBF).....	29
	III.4. Tecnicas de Analisis.....	31
	III.4.1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	31
	III.4.2. Espectroscopia de Dispersión de Energía (EDS).....	31
	III.4.3. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).....	31
	III.4.4. Absorción Atómica.....	32
	III.4.5. Colorimetría.....	32
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>33</b>
	IV.1. Evaluación de las Propiedades Bioactivas.....	34
	IV.1.1. Resultados Microscopia Electrónica de Transmisión....	35
	IV.1.2. Resultados Microscopia Electrónica de Barrido.....	37
	IV.1.3. Resultados Espectroscopia de Dispersión de Energía .....	42
	IV.1.4. Comportamiento del pH y la solubilidad de los iones Ca, P y Si al interactuar los materiales densos con el fluido fisiológico simulado (SBF).....	45
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>VI.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>53</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Imagen de la distribución de los iones hidroxilo, fosforo, oxígeno y calcio, en in corte de celda unitaria de hidroxiapatita .....	10
Figura 2. Análisis termo gravimétrico y térmico diferencial para gel seco obtenido a partir de Nitrato de Calcio y Fosfato de Amonio .....	12
Figura 3. Patrones de difracción de rayos-X del gel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua tratado térmicamente hasta 350°C y 750°C .....	13
Figura 4. Imagen de wollastonita natural.....	14
Figura 5. Imagen de la estructura cristalina de la wollastonita.....	16
Figura 6. Diagrama de flujo para la síntesis de biomateriales de hidroxiapatita estequiometrica, por la ruta sol-gel .....	27
Figura 7. Prensa carver.....	28
Figura 8. Troquel specac.....	28
Figura 9. Imagen de material inmerso en SBF.....	34
Figura 10. Microscopia electrónica de transmisión de wollastonita.....	35
Figura 11. Microscopia electrónica de transmisión del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmerso en agua, tratado térmicamente hasta 350 ° C.....	35

Figura 12. Microscopia electrónica de transmisión del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmerso en agua, tratado térmicamente hasta 750 ° C .....	36
Figura 13. Imágenes de microscopia electrónica de barrido de los materiales sinterizados de wollastonita a 1200°C y 220 Mpa inmersos en la solución SBF. a) 1 semana de inmersión en SBF, b) 2 semanas de inmersión en SBF, c) 3 semanas de inmersión en SBF.....	37
Figura 14. Imágenes de microscopia electrónica de barrido de los materiales de hidroxiapatita tratados térmicamente hasta 350°C y sinterizados hasta 1200°C y 220 Mpa inmersos en solución SBF. a) 1 semana de inmersión en SBF, b) 2 semanas en SBF, c) 3 semanas en SBF.....	39
Figura 15. Imágenes de microscopia electrónica de barrido de los materiales de hidroxiapatita tratados térmicamente hasta 750°C y sinterizados hasta 1200°C y 220 Mpa inmersos en solución SBF. a) 1 semana de inmersión en SBF, b) 2 semanas en SBF, c) 3 semanas en SBF.....	40
Figura 16. Imagen de espectroscopia de dispersión de energía de $\beta$ Wollastonita a) antes del baño fisiológico y b) después del baño fisiológico.....	42
Figura 17. Imagen de espectroscopia de dispersión de energía hidroxiapatita 350°C a) antes del baño fisiológico y b) después del baño fisiológico.....	43

Figura 18. Imagen de espectroscopia de dispersión de energía hidroxiapatita 750°C a) antes del baño fisiológico y b) después del baño fisiológico.....	44
Figura 19. Comportamiento del pH y la variación de la concentración de Ca, P y Si, al interactuar los materiales densos de $\beta$ -wollastonita con el fluido fisiológico simulado (SBF) durante un periodo de inmersión de 1, 2, 3 y 4 semanas .....	46
Figura 20. Comportamiento del pH y la variación de la concentración de Ca y P al interactuar los materiales densos de hidroxiapatita tratados térmicamente hasta 350°C con el fluido fisiológico simulado (SBF) durante un periodo de inmersión de 1, 2, 3 y 4 semanas.....	48
Figura 21. Comportamiento del pH y la variación de la concentración de Ca y P al interactuar los materiales densos de hidroxiapatita tratados térmicamente hasta 750°C con el fluido fisiológico simulado (SBF) durante un periodo de inmersión de 1, 2, 3 y 4 semanas.....	48

## LISTA DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1. Propiedades de la hidroxiapatita.....	11
Tabla 2. Propiedades de la wollastonita.....	17
Tabla 3. Concentración del fluido fisiológico simulado (SBF) propuesto por Kokubo (1990), comparada con el plasma sanguíneo humano .....	20
Tabla 4. Resultado del consumo de los iones de la SBF en contacto con materiales densos de $\beta$ wollastonita.....	45
Tabla 5. Resultado del consumo de los iones de la SBF en contacto con materiales densos de hidroxiapatita 350°C .....	47
Tabla 6. Resultado del consumo de los iones de la SBF en contacto con materiales densos de hidroxiapatita 750°C.....	47



## DEDICATORIA

**A Dios.** Por darme la fuerza necesaria para culminar este proyecto, por trazar mis pasos y tener cuidado de mí en cada momento, por sus procesos que me llevaron hasta este día. Y sobre todo por su inmenso amor, su paz que sobrepasa cualquier entendimiento y gracia incomparable.

1 Corintios 2:9.

**A mis padres.** Roberto Echeverría Sotomayor y Ma. Santos López Rodríguez que fueron pilar fundamental en esta gran aventura llamada universidad, por su apoyo incondicional en todo momento, por la fuerza que lograron transmitirme aun en la distancia, dando el 101 % siempre, gracias por su amor sin condiciones y por levantarme en todo momento.

**A mis hermanos.** Sergio Obeth, Yulma y Roberto Isaac, por ser mis cómplices en este tiempo, por brindarme el amor, confianza y seguridad que necesitaba, por apoyarme y creer en mí en todo momento.

**A mi abuelo.** Roberto Echeverría de la Cruz (1934-2018) por brindarme de su amor, compartir de sus aventuras, ocurrencias y sonrisas, por dejarnos su valentía, su fuerza y su nombre, que en paz descansa.

## **AGRADECIMIENTOS**

**Universidad de Sonora.** Por abrirme las puertas de su institución, brindándome la enseñanza que estuvo a su alcance para formarme como un profesionalista y como persona, para poder afrontar los retos del día a día. Por brindarme los recursos, las instalaciones y reactivos para llevar a cabo este proyecto.

**Al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia.** Por contar con maestros tan calificados, para cada una de las materias, personas que todos los días nos regalaban su tiempo, experiencia y conocimientos.

**A mi tutor de Tesis M.C. Luis Núñez.** Por instruirme en este proyecto final, y estar al pendiente de cada detalle, por el tiempo brindado, y los conocimientos compartidos.

**Al Dr. Martin Encinas Romero.** Por darme la oportunidad de formar parte de este gran proyecto, y por su conocimiento compartido a través de este tiempo.

**Al Dr. Jesús Humberto Coronado.** Por brindarme de su tiempo, y consejos para poder realizar este proyecto de la mejor manera.

**Al Dr. Alejandro Valenzuela.** Por compartir de sus experiencias y tiempo, y consejos para poder concluir este proyecto.

## RESUMEN

Existe una gran variedad de materiales cerámicos que pueden ser usados como implantes en el cuerpo humano. El fosfato de calcio más utilizado en la fabricación de implantes es la hidroxiapatita, por ser el compuesto más parecido al componente mineral de los huesos, presenta buenas propiedades como biomaterial, tales como biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad y unión directa al hueso[1].

En el presente trabajo, se evaluó la bioactividad de biomateriales densos, sinterizando compositos de hidroxiapatita y wollastonita natural, mediante una ruta sol-gel alternativa, utilizando como agentes precursores, nitrato de calcio y fosfato de amonio. La formación de la hidroxiapatita se produce a dos temperaturas diferentes una de 350°C y otra de 750°C se tomaron estas temperaturas ya que a 350°C se muestra a la hidroxiapatita en sus primeras etapas de cristalización y en 750°C observamos una wollastonita totalmente cristalizada. La formación de wollastonita  $\beta$  se produjo de manera natural, utilizando la wollastonita en su forma base sin necesidad de agentes precursores. Posteriormente estos compositos se sinterizaron a una temperatura de 1200°C durante 5 horas para producir materiales densos.

Para evaluar las propiedades biológicas de los compositos se realizaron las pruebas de bioactividad, mediante la interacción de los materiales densos con el fluido fisiológico simulado, durante estos tiempos se observó la formación de una capa de apatita neo formada sobre la superficie de la pastilla, siendo esta capa muy similar a las apatitas biológicas que componen el tejido óseo.

Las técnicas de caracterización que se utilizaron fueron el microscopio electrónico de transmisión, microscopio electrónico de barrido y espectroscopia de dispersión de energía los cuales nos revelaron la presencia de hidroxiapatita y wollastonita en nuestros materiales densos.

Mientras que a las soluciones se les midieron las concentraciones de calcio y silicio por medio del método instrumental de absorción atómica y la concentración de fósforo por la técnica de colorimetría.

## **I. INTRODUCCION**

El hueso es el único tejido en el organismo de los vertebrados que al ser dañado es capaz de regenerarse por medio de la creación de un tejido exactamente igual al original. Habitualmente, la dinámica de formación del hueso es suficiente para reconstruir los defectos comunes, sin embargo en lesiones mayores es necesario recurrir al aporte de biomateriales naturales o sintéticos, para lograr la reparación. Al incrementarse las expectativas de vida, el número de pacientes con problemas o lesiones óseas aumenta dramáticamente. La búsqueda de posibles soluciones de tejido óseo ejerce una fuerte demanda de materiales capaces de sustituir o reparar los tejidos duros del organismo (huesos y dientes) [1].

Los biomateriales son sustancias naturales o sintéticas, que se introducen o suministran al organismo de manera temporal o permanente, como implantes o prótesis para reparar lesiones en los tejidos del organismo. Actualmente, existen numerosos estudios e investigaciones acerca de nuevas propiedades y posibles aplicaciones de materiales con propiedades biocompatibles, es decir, materiales que pueden funcionar en sistemas biológicos [2].

La hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), es el componente mineral predominante de los huesos de los vertebrados, el esmalte que cubre los dientes contiene este mineral. Sus aplicaciones clínicas son de gran relevancia, debido a que es el cerámico de fosfato de calcio químicamente más parecido a los cristales de las apatitas biológicas.

Por tal razón, se han desarrollado diversas metodologías para su preparación, entre las que destacan métodos de precipitación, reacciones de estado-sólido, procesos sol-gel [3].

Sin embargo, la hidroxiapatita sintética presenta propiedades mecánicas pobres, de tal forma que su uso se ha destinado principalmente a recubrir otros materiales con propiedades mecánicas más resistentes.

Uno de los materiales de refuerzo más importantes es la wollastonita,  $\text{CaSiO}_3$ , un silicato de calcio, de la cual varios trabajos de investigación han evidenciado sus características bioactivas, colocándola a la vanguardia con potenciales aplicaciones como fase de refuerzo para otros biomateriales [4].

El proceso sol gel, es uno de los métodos más importantes para la producción o síntesis de nuevos materiales. Además de las ventajas comerciales, tales como bajos costos de producción, bajo consumo de energía e impacto ambiental casi nulo, el uso de bajas temperaturas en estas técnicas, hace posible tener estricto control de los parámetros del proceso, con mayor flexibilidad, en relación al uso de altas temperaturas en los procesos tradicionales.

Entre las ventajas del método sol-gel, para la síntesis o producción de biomateriales inorgánicos se encuentran: nuevas composiciones, mejor control de distribución de tamaños en polvos, control de la química de superficie, control de las redes de poros en escalas nanométricas, altos niveles de pureza, entre otras. Para el caso de la síntesis de fosfatos de calcio, el método sol-gel, permite un eficiente mezclado molecular de calcio y fósforo, mejorando la homogeneidad química de los productos.

Asimismo, la alta reactividad de los materiales producidos vía sol-gel permite la reducción de temperaturas y evitan cualquier fenómeno de degradación durante las etapas de sintonización posteriores. Además se ha demostrado que los materiales sintetizados por esta vía tienen mejores características biológicas, así como respuestas bioactivas más eficientes, en relación con los materiales formados por los métodos tradicionales [4].

Entre los principales inconvenientes de la técnica gel, para la producción de hidroxiapatita, se encuentran las bajas velocidades de hidrolisis de algunos agentes precursores de fosfatos [5]. Sin embargo, estas desventajas representan un interesante campo de investigación, dando lugar al estudio de rutas y reactivos alternativos, que permitan contrarrestar tales inconvenientes, con el fin de aprovechar las bondades que esta técnica ofrece.

## **I.1 Objetivo General**

El objetivo general de este trabajo comprende la síntesis, caracterización y evaluación de las propiedades biológicas, de biomateriales densos sinterizados de wollastonita natural e hidroxiapatita, preparada mediante la técnica sol-gel, inmersos en fluidos fisiológicos simulados.

## **I.2 Objetivos Particulares**

### **a) Producir biomateriales en forma de polvos**

1. Producir hidroxiapatita mediante una técnica sol-gel, utilizando como agentes precursores, nitrato de calcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) y fosfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ).
2. Caracterizar estructuralmente la hidroxiapatita, producto de esta técnica de síntesis.

### **b) Producir biomateriales densos**

3. Sinterizar los biomateriales de hidroxiapatita y wollastonita natural.
4. Evaluar las propiedades biológicas de los biomateriales sinterizados de hidroxiapatita y wollastonita natural *in vitro*:
  - Evaluar bioactividad



## **II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS**

Según los demógrafos de Naciones Unidas, dentro de unos 5 años es muy probable que haya más personas de más de 60 años, que niños de menos de 15. Hoy en día una de cada diez personas tiene 60 años o más, pero en el año 2050, se prevé que será una de cada cinco. Y se prevé también que, el número de los que tienen unos 80 años se multiplicará por cinco. La longevidad masiva tiene implicaciones individuales relacionadas con mantener la calidad de vida.

Estos factores sociológicos han impulsado un gran avance en biomateriales, y han potenciado la investigación en este campo. Si a esto, se le añade la mejora de las técnicas quirúrgicas, se puede entender el crecimiento acelerado en la utilización de prótesis, implantes, sistemas y aparatos médicos que deben trabajar en contacto con los tejidos corporales [16].

Los materiales que se emplean para la fabricación de implantes son de naturaleza diversa; pueden elaborarse con tejidos de los mismos pacientes (autoinjerto), con tejidos de algún donante humano (homoinjerto) o de otras especies (heteroinjerto), así como a partir de materiales hechos por el propio hombre (aloinjertos); a estos últimos se les conoce como biomateriales, y pueden ser de origen sintético o natural (pero modificados por el hombre). Estos se utilizan en la fabricación de dispositivos médicos capaces de desempeñar diferentes funciones en el organismo humano [14].

## II.1. Biomateriales

Hablar de biomateriales, implica hablar de materiales capaces de estar en contacto con tejidos vivos, durante un periodo de tiempo, como parte del tejido, con la finalidad de completar al tejido y/o ayudar a mejorar el funcionamiento de este cuando forma parte de un sistema, sin afectar al resto del organismo y sin ser afectado por el. Podemos interpretar la biocompatibilidad de un material, como la aceptabilidad biológica del material por el organismo de una persona [13].

Generalmente, se requiere un injerto o un sustituto de hueso para ayudar o completar la reparación de una deficiencia esquelética debida a trauma, tumores o desarrollo anormal, y así restaurar la función normal del tejido.

Un biomaterial, no es más que una sustancia o una combinación de sustancias, que puede ser usada por un período de tiempo, como un todo o formando parte de un sistema que trata, aumenta o sustituye un tejido, órgano o función del cuerpo. Es decir, un material no vivo usado como dispositivo médico dirigido a interactuar con el sistema biológico [12].

Para el desarrollo de nuevos biomateriales deben tenerse en cuenta algunos factores como:

- Ser biocompatible, es decir, debe ser aceptado por el organismo, no provocar que éste desarrolle sistemas de rechazo ante la presencia del biomaterial
- Ser químicamente estable (no presentar degradación en el tiempo) e inerte.
- Ser osteoactivo, es decir, debe estimular la formación de nuevo hueso. La osteoactividad se manifiesta en el carácter osteoinductor y/o osteoconductor del implante. Alternativamente, un material puede estimular la sustitución por pasos, es decir, al mismo tiempo que se reabsorbe se produce un nuevo hueso en su lugar.
- No ser tóxico, ni carcinógeno

Por biocompatibilidad, se entiende la capacidad del biomaterial o dispositivo médico implantable, para ser tolerado por el organismo o aceptado por el medio biológico, que lo va a rodear, una vez implantado [14].

Las propiedades biológicas de los biomateriales, relacionadas con su interacción con el medio fisiológico que los rodea, se pueden clasificar en:

- Bioinertes: se refiere a un material que conserva su estructura en el cuerpo, después de la implantación y no induce ninguna reacción inmunológica en el huésped.
- Bioactivos: se refiere a materiales que forman enlaces con los tejidos vivos.
- Biodegradables: se refiere a materiales que se degradan (por descomposición hidrolítica), en el cuerpo mientras están siendo reemplazados por regeneración de tejido natural, los subproductos químicos de los materiales de degradación, son absorbidos y se liberan a través de los procesos metabólicos del cuerpo [15].

Los biomateriales están destinados a su aplicación en seres vivos, y para su fabricación se requiere la coordinación de expertos de muy diversos campos. El campo de los biomateriales, ha experimentado un espectacular avance en los últimos años y una motivación importante, para ello ha sido el hecho de que la esperanza de vida aumente de forma considerable [16].

## II.2. Hidroxiapatita

La hidroxiapatita, es un fosfato de calcio con una composición química muy similar a la del hueso humano, lo cual la hace biocompatible con los tejidos vivos, es una apatita compuesta esencialmente por fósforo y calcio. Su fórmula corresponde a  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .

Está presente en dientes y huesos, confiriéndoles su dureza característica, pertenece a la familia de las apatitas, presenta una estructura hexagonal. En la naturaleza, las apatitas se pueden encontrar formando parte de las rocas sedimentarias y metamórficas. En los huesos, está siempre acompañada de estructuras orgánicas como la colágena. Otras apatitas de importancia biológica son la fluoroapatita y la cloroapatita [8].

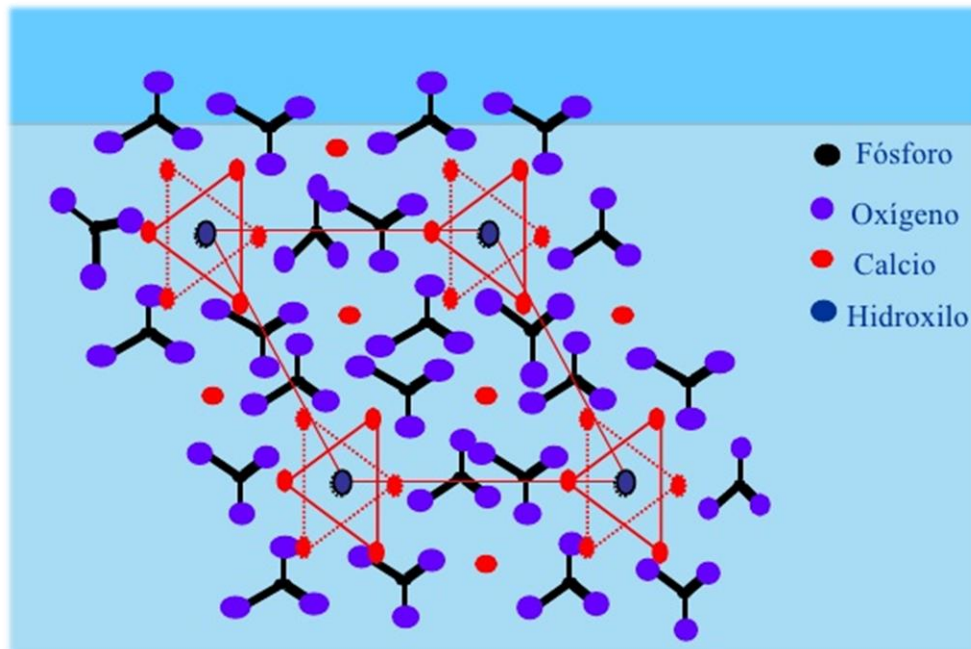


Figura 1. Imagen de la distribución de los iones hidroxilo, fósforo, oxígeno y calcio, en un corte de celda unitaria de hidroxiapatita.

La hidroxiapatita sintética no cerámica, equivale a la porción del hueso humano desde el punto de vista físico, químico y cristalográfico. Es un material que reabsorbe lentamente, actuando como matriz ósea, sobre la que se va depositando el hueso neoformado. Está constituida por partículas esféricas de alta densidad y pureza.

La osteoconduccion, es una de las características más notables, ya que esto nos dice que la hidroxiapatita favorece el crecimiento del hueso hacia sí mismo, contando con una interacción entre ellos, volviéndolo atractivo para su uso como recubrimiento de implantes metálicos, así como para el relleno de defectos óseos.

Tabla I. Propiedades de la hidroxiapatita.

<b>Propiedad</b>	<b>Característica</b>
Formula Química	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Color	Blanco, gris, amarillo, verde, violeta, purpura, rojo o marrón.
Sistema Cristalino	Hexagonal
Dureza	5 (Mohs)
Densidad	3,16 g/ml
Esfuerzo de Tensión	40-100 Mpa
Módulo de Young	70-120 GPa

En las últimas décadas se han empleado diferentes biomateriales, como vidrio alúmina, polietileno y cerámicas de fosfato de calcio, para la reconstrucción de defectos óseos. Entre éstos, la hidroxiapatita, ha presentado resultados satisfactorios como material de implante óseo; sus principales ventajas, son las excelentes biocompatibilidad y bioactividad. Sin embargo debido a los problemas existentes al utilizarlos, se han realizado investigaciones con diferentes materiales, incluyendo biológicos, polímeros, cerámicos y combinaciones de estos, tratando de encontrar el material ideal que los reemplace. Actualmente, se estudian diferentes minerales que proporcionen a la hidroxiapatita una fase de refuerzo, que aumenten sus propiedades mecánicas sin afectar sus propiedades biológicas [19].

### II.2.1. Cristalización de la hidroxiapatita 350°C /750°C.

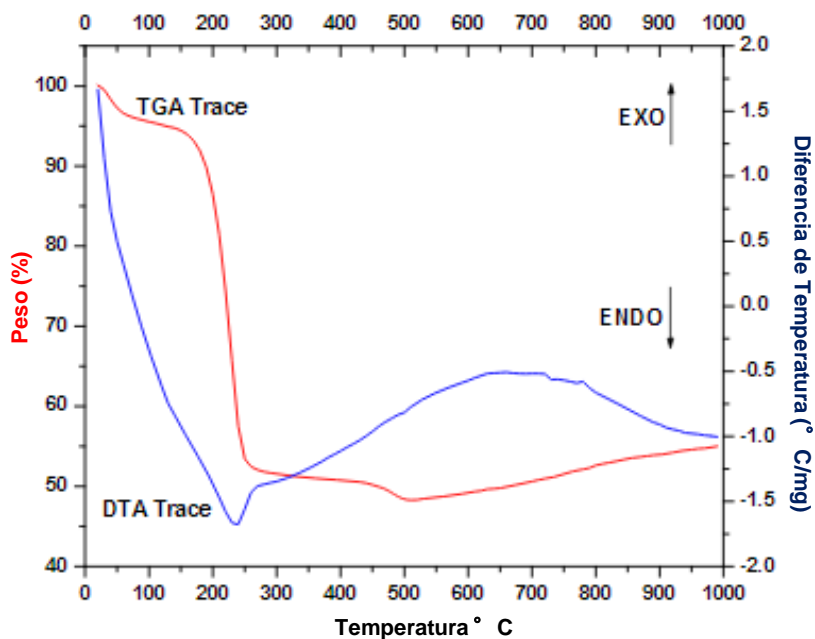


Figura 2. Análisis termogravimétrico y diferencial para gel seco obtenido a partir de Nitrato de Calcio y Fosfato de Amonio.

La Figura 2, muestra el análisis termo gravimétrico (TGA) combinado con análisis térmico diferencial (DTA), para el gel seco de Nitrato de Calcio y Fosfato de Amonio, desde la temperatura ambiente hasta 1000°C. Las líneas del gel seco muestran una transición térmica en la región de temperatura de 180°C a 350°C, lo que corresponde a una pérdida de peso de aproximadamente 40% con un pico exotérmico aproximadamente 280°C.

Esta pérdida de peso, podría estar asociada a la formación de hidroxiapatita en sus primeras etapas de cristalización. Se observa un proceso térmico adicional entre los 500°C y 700°C, correspondiente a una pérdida de peso insignificante, y representada por un pico exotérmico aproximadamente a los 650°C, la cual podría ser debido a la formación de hidroxiapatita en etapas más avanzadas de cristalización.

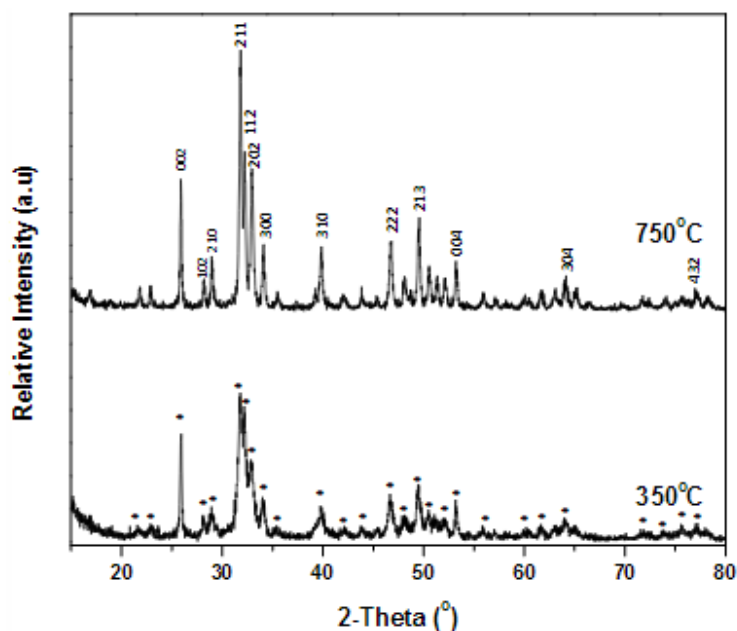


Figura 3. Patrones de difracción de rayos-X del gel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua tratado térmicamente hasta 350°C y 750°C.



La figura 3, muestra los patrones de DRX para el gel seco de nitrato de calcio y fosfato de amonio en agua, después del tratamiento térmico a 350°C y 750°C. Esta figura muestra que, el gel tratado a 350°C se transforma en hidroxiapatita en una etapa de cristalización temprana; cuando el gel se trató a 750°C, se convierte en hidroxiapatita perfectamente cristalizada. En ambos casos el análisis revela la presencia de hidroxiapatita, como fase individual en los materiales. Por lo anterior, la hidroxiapatita en los biocompósitos de este estudio, se sintetizó hasta 750°C para obtener este material biocerámico completamente cristalizado [14].

### II.3. Wollastonita

La wollastonita, es un silicato de calcio natural con formula molecular ( $\text{CaSiO}_3$ ), tiene una composición en peso teórico de 48.3% de óxido de calcio ( $\text{CaO}$ ) y 51.7% de dióxido de Silicio ( $\text{SiO}_2$ ). Presenta forma acicular (forma de agujas), misma que le permite ser utilizada como componente de refuerzo para otros minerales [6].

Desde la década de los 90, la wollastonita ha sido considerada objeto de estudio como material artificial para implante en huesos y piezas dentales, debido a que este material exhibe buenas características de biocompatibilidad y bioactividad, tanto en estudios "*in vitro*" como en estudios "*in vivo*".

Varios investigadores han reportado una rápida formación de una capa de apatita  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3 (\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})$  sobre la superficie de la wollastonita, cuando están inmersos en fluidos fisiológicos simulados (SBF) [7].



Figura 4. Imagen de wollastonita natural.

La reacción metamórfica, entre sílice y carbonato de calcio para formar wollastonita, ocurre aproximadamente a 450-600°C y profundidades cercanas a la superficie [10]. La reacción química a través del contacto metamórfico de sílice y caliza ocurre según la reacción siguiente:



La wollastonita, es un mineral polimorfo, es decir, posee diferentes estructuras físicas, bajo la misma composición química  $\text{CaSiO}_3$ . Los dos polimorfismos más conocidos son: wollastonita formada a baja temperatura, ( $\beta$ -wollastonita) y pseudowollastonita formada a alta temperatura, ( $\alpha$ -wollastonita).

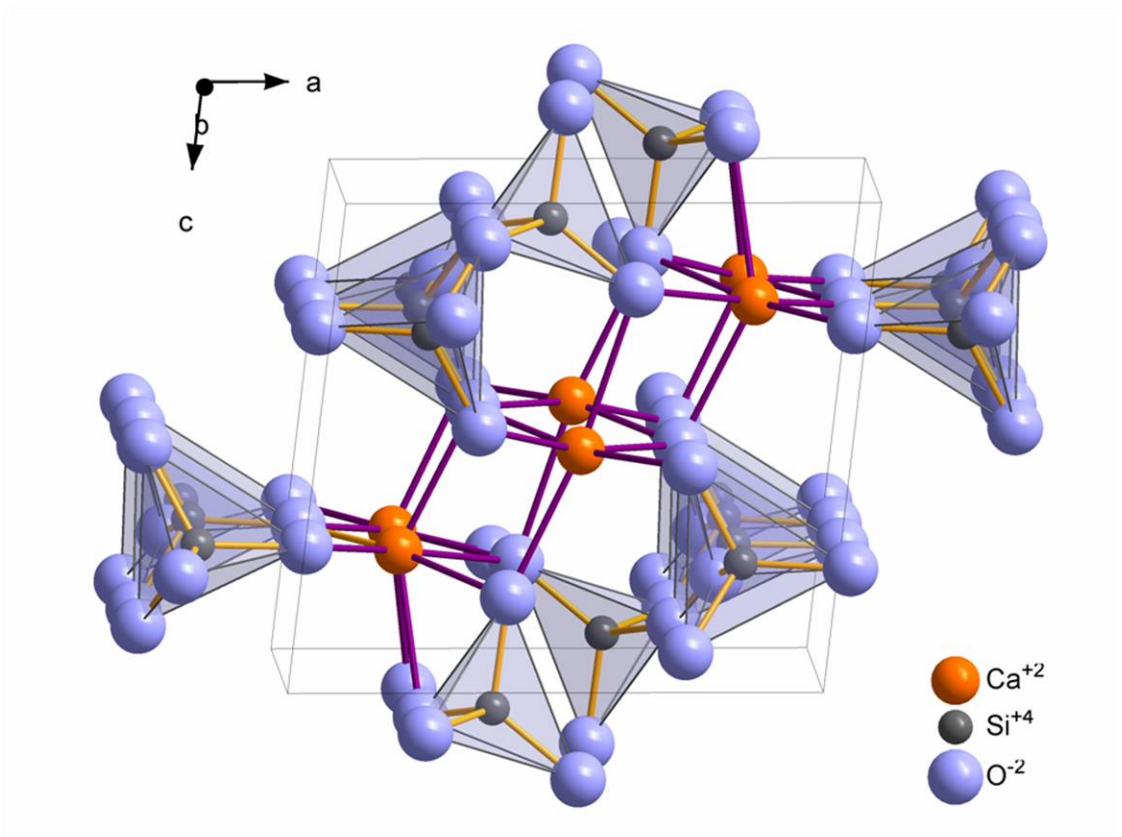


Figura 5. Imagen de la estructura cristalina de la wollastonita.

Está clasificada como un mineral sin riesgos para la salud, el material acicular puede contribuir como reforzante en un material híbrido, por lo que ofrece un gran potencial en la industria de resinas y plásticos, la wollastonita contribuye a mejorar las propiedades físicas, químicas.

Tabla II. Propiedades de la wollastonita.

<b>Propiedades</b>	<b>Característica</b>
Formula	CaSiO <sub>3</sub>
Elementos Químicos	Ca, Si, O
Composición Química	Si: 24.18%, Ca:50%, O:41.32%
Morfología	Acicular
Peso Molecular	116 g/mol
Índice de Refracción	1.63
Punto de Fusión	1540 ° C
Dureza	4.5-5 MOHS
Estructura del cristal	$\alpha=90,03^\circ$ $\beta=95,37^\circ$ $\gamma=103,43^\circ$
Color	Amarillo, Blanco, Rojo, Gris
Densidad	181 lbs/ft <sup>3</sup>

En la wollastonita, los iones de calcio se encuentran en un entorno octaédrico rodeados de 6 átomos de oxígeno. En la naturaleza pueden encontrarse otros iones que sustituyen al calcio como el hierro y el manganeso, formando ferrowollastonita y manganowollastonita respectivamente [7].

Respecto a su geología económica, México es uno de los principales países productores a nivel mundial, conjuntamente con EUA, India, Finlandia y China. Prácticamente, la totalidad de la producción nacional se destina a la exportación. Los principales yacimientos se encuentran en el estado de Sonora (Hermosillo, Roca Rodando), Zacatecas (Pánfilo Natera) e Hidalgo (Villa Juárez), siendo el depósito de Hermosillo de gran escala y los de Pánfilo Natera y Villa Juárez, de pequeña y mediana producción [7].

Actualmente, se considera que Sonora produce casi la totalidad del mineral de wollastonita en México; una mínima parte procede de depósitos muy conocidos en Zacatecas [11].

## II.4. Fluido Fisiológico Simulado

El plasma sanguíneo, es la porción líquida de la sangre en la que están inmersos los elementos que forman la sangre (eritrocitos, leucocitos y trombocitos). El volumen plasmático total se considera como de 40-50 ml/kg en peso. La sangre se compone de glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas y plasma.

Las sustancias que componen el plasma, son agua (hasta 95% en volumen), proteínas disueltas (albuminas séricas, globulinas y), glucosa, factores de coagulación, electrolitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ), hormonas, dióxido de carbono y oxígeno. El propósito principal del plasma es transportar nutrientes, hormonas y proteínas a las partes del cuerpo que lo necesitan. A su vez, las células también depositan sus productos de desecho en el plasma para que se eliminen.

El fluido fisiológico simulado (SBF) o plasma humano sintético, es una solución con una concentración iónica similar a la del plasma de la sangre humana, que se mantiene en las mismas condiciones de pH y temperatura fisiológicas.

Una gran parte de la comunidad científica, ha aceptado el paradigma de que un fluido fisiológico simulado (SBF), se puede utilizar para evaluar la bioactividad de un material.

En los primeros estudios in vitro de bioactividad de biovidrios, se demostró que ocurre una liberación de iones de calcio y fósforo hacia la solución, así como la modificación del pH y la formación de una película de apatita sobre la superficie del biovidrio. Para que esto suceda, debe encontrarse en una solución búfer de tris (hidroximetil) aminometano con HCl a un pH de 7.25 (tris búfer) a 37°C.

De acuerdo a T. Kokubo (1990), se propuso una solución fisiológica simulada SBF, la cual es una solución sin células, con un pH y una concentración iónica similar al plasma sanguíneo humano. La solución SBF, contiene iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ , lo cual le permite ser usada para estudiar la bioactividad in vitro una gran variedad de materiales. En este tipo de estudios in vitro, cuando los materiales

bioactivos se ponen en contacto con esta solución, ocurren tres fenómenos: i) liberación de iones, ii) modificación del pH y iii) crecimiento de una capa de apatita sobre la superficie del material.

En trabajos independientes (T. Kokubo y L. Hench), confirmaron la formación de apatita sobre la superficie del *biovidrio* 45S5, cuando se pone en contacto con la solución SBF. Se analizó por técnicas de difracción de rayos-X de película delgada (TF-XRD), espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR), microscopio electrónico de barrido, y microscopio electrónico de transmisión, la capa de apatita neoformada, mostro que esta era similar al componente inorgánico de los huesos, tanto en estructura como en composición [9].

#### II.4.1. Diseño de la Solución de Fluido Fisiológico Simulado (SBF)

Tabla III. Concentración del fluido fisiológico simulado (SBF) propuesto por Kokubo (1990), comparada con el plasma sanguíneo humano.

Concentración de los iones (Mm)								
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
<b>SBF</b>	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.20	1.0	0.5
<b>Plasma Sanguíneo</b>	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5

Es preciso mencionar, que la composición de la solución SBF mostrada en la tabla anterior, es una formulación corregida por el mismo T. Kokubo (1990), ya que la formulación original (original SBF), no consideraba a los iones  $\text{SO}_4^{2+}$  contenidos en el plasma humano.

Esta formulación ha sido objeto de varias modificaciones, las cuales tratan de corregir las diferencias existentes entre esta solución y el plasma sanguíneo.

Como se observa en la tabla III esta solución corregida comparada con el plasma sanguíneo humano es aún rica en ion  $\text{Cl}^-$  y deficiente en ion  $\text{HCO}_3^-$ .

Takadama (2004), propuso una nueva mejora a la SBF conocida como “newlyimproved” SBF (n-SBF), en el que disminuyeron solo el ion  $\text{Cl}^-$  con una concentración al nivel de plasma sanguíneo humano, dejando el  $\text{HCO}_3^-$  con una concentración de iones igual a la del SBF corregido (c-SBF). Este SBF mejorado, se comparó con el c-SBF, en su estabilidad y la reproducibilidad de la formación de apatita en materiales sintéticos. Como resultado, se confirmó que el c-SBF no difiere de la n-SBF en estabilidad y reproducibilidad.

## **II.5. Proceso sol-gel**

La técnica Sol-gel es una herramienta experimental utilizada para el desarrollo de nuevos materiales. Este procedimiento químico consiste en transformar una solución que contiene un ion metálico en una gelatina o un precipitado, mediante reacciones químicas en condiciones sencillas de presión y temperatura ambiente [14].

Un sol, es una dispersión de partículas coloidales en fase líquida que son suficientemente pequeñas para permanecer suspendidas por movimiento Browniano. Un gel, es un sólido consistente de al menos dos fases: una fase sólida que forma una red que atrapa e inmoviliza a una fase líquida [14].



En el proceso sol-gel la solución o precursor puede incluir alcóxidos metálicos, soluciones salinas metálicas, y otras soluciones conteniendo complejos metálicos. Los precursores más comúnmente utilizados en el proceso sol-gel son los alcóxidos metálicos.

Estos reaccionan con agua, a través de las reacciones de hidrólisis y condensación (que es prácticamente una polimerización), hasta conducir a un óxido metálico amorfo, el alcohol producido durante la reacción de hidrólisis se remueve fácilmente durante el proceso. El término “sol-gel”, se aplica entonces ampliamente para describir la síntesis de óxidos inorgánicos por los métodos de la química tradicional.

El producto de las transiciones sol-gel, se conoce como alcogel. Después de la transición sol-gel, la fase solvente se remueve de los poros de la red interconectada. Si se remueve mediante un tratamiento térmico convencional, el resultado es un xerogel [17].

Este procedimiento consiste de cuatro etapas:

- Preparación del sol.
- Gelificación.
- Envejecimiento.
- Secado y tratamiento térmico.

Las ventajas del procedimiento sol-gel, se encuentran generalmente en la química básica y, en el proceso práctico y en la posibilidad de obtener sólidos amorfos singulares. Por singular entendemos materiales con propiedades muy superiores a las que se pueden obtener por métodos convencionales, con composiciones químicas fuera del intervalo normal [18].

## **II.6. Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM).**

El Microscopio electrónico de transmisión, dirige un haz de electrones hacia el objeto que se desea aumentar, una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada del espécimen.

El microscopio electrónico de transmisión es capaz de producir imágenes directas de la estructura de secciones delgadas del material (100-200 Angstroms), al igual que permite la obtención de forma instantánea de diagramas de difracción orientados, consta de componentes como: sistema de vacío, cañón de electrones, sistema de lentes y sistema de detección.

Para utilizar un TEM, debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores de un par de miles de Angstroms. Se coloca una placa fotográfica o una pantalla fluorescente detrás del objeto para registrar la imagen aumentada.

## **II.7. Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).**

El microscopio electrónico de barrido es, un equipo diseñado para que un fino haz de electrones, haga una exploración (barrido) sistemática de la muestra en observación, produciéndose así electrones secundarios, que una vez recogidos por un detector son empleados como una señal a partir de la cual se obtiene, en la pantalla de un tubo de rayos catódicos, una imagen.

Los dos componentes principales de un SEM, son la columna de electrones y la consola de control. La columna de electrones consiste en un cañón de electrones y dos o más lentes electromagnéticos, que influyen en las trayectorias de los electrones, además cuenta con bombas de vacío que producen un vacío de aproximadamente  $10^{-4}$  Pa. La consola de control, se compone de un tubo de rayos catódicos (TRC), pantalla de visualización, botones y un teclado de computadora con el cual se controlan los parámetros de operación.

### **III. MATERIALES Y METODOS**

### **III.1 Síntesis de Hidroxiapatita Estequiometrica 350°C/750°C.**

Para sintetizar hidroxiapatita (Estequiometrica) por la ruta sol-gel, se desarrollaron los pasos siguientes:

1. Primeramente en un vaso de precipitado de 100 ml, se agregan 10 ml de agua deionizada.
2. Después se agregan 3.8704 gramos de nitrato de calcio, agitando la solución durante 15 minutos en un baño ultrasónico.
3. Posteriormente se agregan 1.292 gramos de fosfato de amonio y nuevamente se agita en el baño ultrasónico por un lapso de 30 minutos, esto hasta que se mezclen totalmente los reactivos precursores.
4. El material se somete a una nueva etapa de agitación, ahora por acción magnética por un tiempo de 2 horas, durante esta etapa se inicia el monitoreo constante del pH, mismo que se controla entre los valores de 6 y 7, con la adición de Hidróxido de Amonio, hasta obtener el Xerogel húmedo.
5. Seguidamente el Xerogel húmedo se somete a un tratamiento de secado por un lapso de 12 horas, a una temperatura de 120°C.
6. Una vez obtenido el Xerogel seco, éste se somete a un tratamiento térmico hasta 350°C, con una rampa de calentamiento de 10°C por minuto, manteniéndose a esta temperatura por 3 horas, con el fin de hacer reaccionar todos los componentes de la muestra.

Terminada esta etapa, el material se deja enfriar dentro del horno apagado, por un período de 12 horas, obteniéndose aproximadamente 1.0 gr de hidroxiapatita estequiometrica.

7. Una segunda síntesis, se desarrollará para tratar térmicamente el Xerogel seco, hasta 750°C, con una rampa de calentamiento de 10°C por minuto, manteniéndose a esta temperatura por 5 horas, con el fin de hacer reaccionar todos los componentes de la muestra.

Terminada esta etapa, el material se deja enfriar dentro del horno apagado, por un período de 12 horas, obteniéndose aproximadamente 1.0 gr de hidroxiapatita, con diferentes características, comparada con la producida a 350°C.

Se hicieron 2 corridas de cada uno, para obtener un total de 2 gr de cada material (350°C y 750°C).

Los materiales fueron caracterizados mediante las técnicas de, Espectrometría de dispersión de energía de rayos X, microscopia electrónica de barrido y microscopia electrónica de transmisión.

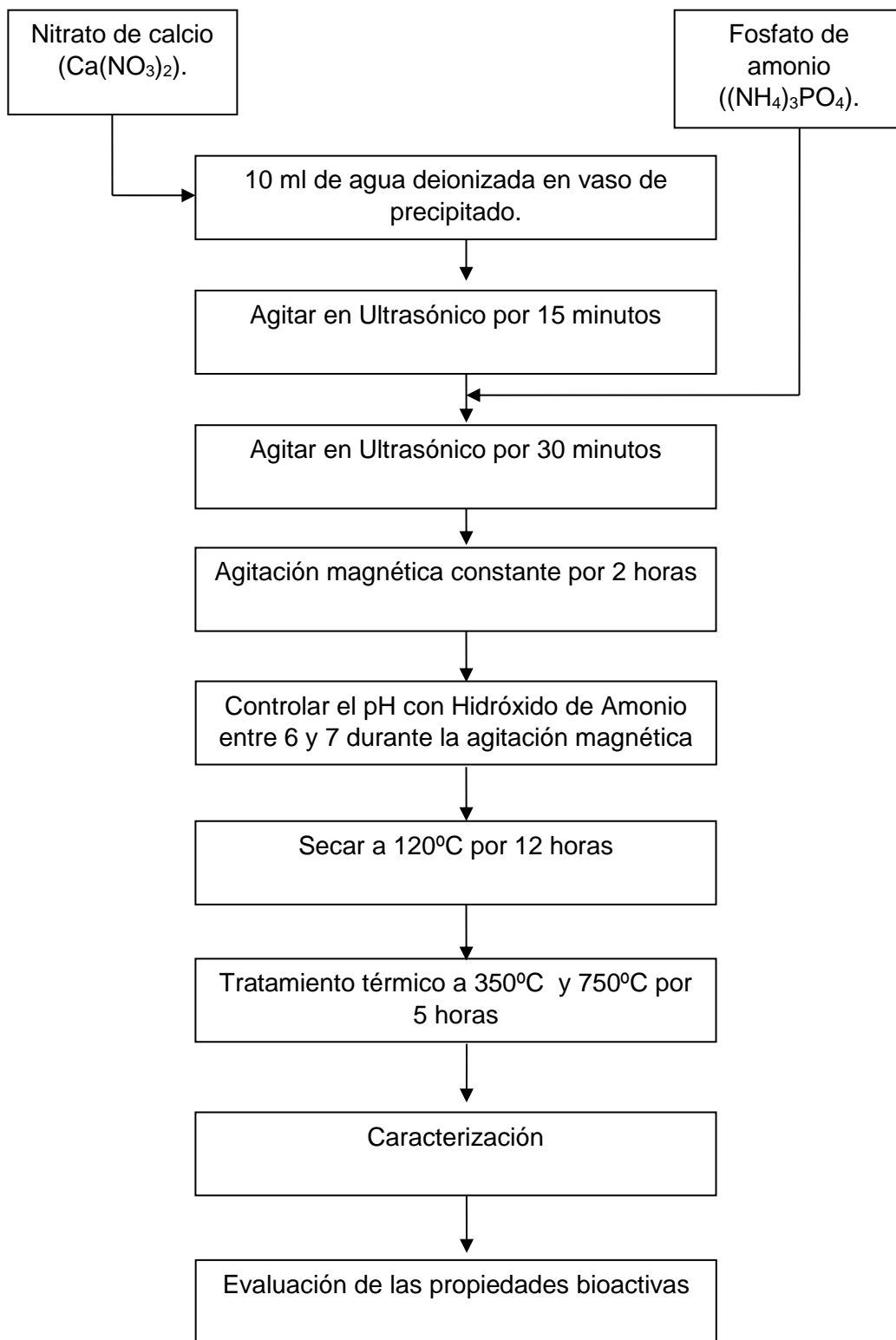


Figura 6. Diagrama de flujo para la síntesis de biomateriales de hidroxiapatita estequiometrica, por la ruta sol-gel.

### III.2. Sinterización de los Materiales Hidroxiapatita 350°C/750°C y $\beta$ Wollastonita.

Se produjeron materiales densos en forma cilíndrica mediante presión uniaxial de 0.5 g de polvo, colocados en un troquel Specac (10 mm DIE) con carga máxima de 5 TON, comprimidos en una prensa Carver 3912 (Carver Inc., Wabash, IN), a una presión de 220 MPa durante 5 min. La sinterización se desarrolló en un horno de alta temperatura Thermo Scientific (Lindberg Blue M) a 1200°C. El proceso térmico se desarrolló a una velocidad de 2°C/min desde la temperatura ambiente hasta la temperatura de sinterización, manteniéndose a esta temperatura durante 5 h, seguido por un enfriamiento a una velocidad de 2°C/min.



Figura 7. Prensa carver.



Figura 8. Troquel specac.

### III.3. Preparación del Baño Fisiológico Simulado (SBF)

La solución SBF se formuló a partir de los reactivos y las cantidades siguientes.

- Cloruro de Sodio (NaCl), 99%, Jaltek, NL, México), 7.996 g/L
- Bicarbonato de sodio. (NaHCO<sub>3</sub>, 99.7%, Jaltek, NL, México), 0.350 g/L.
- Cloruro de potasio, (KCl, 99%. Jaltek, NL, México), 0.224 g/L
- Fosfato de potasio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>· 3H<sub>2</sub>O, 99%, sigma-Aldrich, St. Louis, México), 0.228 g/L
- Cloruro de magnesio hexahidratado. (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 99.3%, Jaltek, NL, México), 0.305 g/L
- Cloruro de calcio, (CaCl<sub>2</sub> 97.7%, Jaltek, NL México), 0.278 g/L
- Sulfato de sodio, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 99%, Jaltek. NL México), 0.071 g/L
- Tris-(hidroximetil)-aminometano, (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>, 99.8%, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ), 6.057 g/L
- Ácido clorhídrico, (HCl, Fermont, NL México), 1M.

En la preparación de la solución SBF, debe evitarse el uso de recipientes de vidrio, ya que sobre su superficie puede inducirse la nucleación de apatita. En su lugar se deben utilizar recipientes de plástico con superficies suaves. La solución SBF se preparó en un recipiente de plástico con superficies suaves.

La solución SBF, se preparó en un recipiente de plástico, disolviendo las cantidades apropiadas de cada uno de los reactivos en agua de ionizada, añadiéndolos uno por uno, en el orden indicado anteriormente, hasta que cada



reactivo se disolvió completamente. Se consumieron aproximadamente 40 mL de HCl 1M para ajustar el pH a 7.4 en 1 L de solución.

La solución SBF, es una mezcla súper saturada, cualquier método de preparación inapropiado puede generar una precipitación. Por tal razón, en todo momento durante la elaboración, se debe distinguir una solución transparente, libre de cualquier indicio de precipitación, si aparece cualquier tipo de precipitado la preparación debe detenerse, eliminando la solución y empezar otra preparación.

Para preparar 1L de solución, los reactivos se disolvieron en 700 ml de agua deionizada, la cual se ajusta previamente a 37°C en una placa calefactora provista de agitación magnética. Aproximadamente el 90% del ácido clorhídrico se añade, antes de agregar el cloruro de calcio. Después de agregar el sulfato de sodio el volumen de la solución se ajustó a 900 ml con agua de ionizada, manteniendo la temperatura a 37°C. Se introdujo el electrodo de pH en la solución, justo antes de agregar el tris (hidroximetil)-aminometano. El pH de la solución se encontró de 2.0–1.0.

Se añadió el tris (hidroximetil) aminometano poco a poco, esperando a que se disolviera completamente y observando el aumento gradual de pH en la solución, hasta que ésta alcanza un valor de  $\text{pH} \approx 7.3$ . Este reactivo no debe agregarse de forma rápida, ya que un incremento radical del pH puede ocasionar una precipitación de fosfato de calcio en la solución. Seguidamente se ajustó la temperatura a 37°C y se agregó más tris-(hidroximetil)-aminometano hasta alcanzar un valor de  $\text{pH} \approx 7.45$  en la solución.

Posteriormente, se añadió en gotas la cantidad de HCl 1M, necesaria para ajustar el  $\text{pH} \approx 7.42$ , agregando de nuevo la cantidad necesaria de tris-(hidroximetil)-aminometano. Para volver a alcanzar un  $\text{pH} \approx 7.45$ , para bajarlo de nuevo hasta  $\text{pH} \approx 7.42$  con HCl 1M. Se repite esta operación, hasta que todo el tris-

(hidroximetil)-aminometano se agregó a la mezcla, ajustando finalmente el  $\text{pH} \approx 7.42$  con HCl 1M. Finalmente, se retiró de la solución el electrodo de pH, se lavó con agua deionizada y esta se agregó a la solución.

La solución se retiró del recipiente plástico y, se colocó en un recipiente volumétrico, la superficie del recipiente plástico se lavó en repetidas ocasiones con agua deionizada, esta agua de lavado se añadió a la solución, llenando casi hasta la marca de 1L.

### **III.4. Técnicas de Análisis.**

#### **III.4.1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).**

Para el análisis de la morfología de los materiales densos, se utilizó un SEM (microscopio electrónico de barrido), marca Philips modelo XL30 ESEM, todas las micrografías presentadas se obtuvieron utilizando un recubrimiento oro/paladio utilizando un Sputtering Sputter Coater (SC7620).

#### **III.4.2. Espectroscopia de Dispersión de Energía (EDS).**

Los espectros de dispersión de energía se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido, marca Philips modelo XL30 ESEM, que cuenta con un Sistema de Microanálisis por EDS, marca EDAX, modelo génesis, equipado con un detector de rayos-X, característicos para el análisis cualitativo y semicuantitativo de la composición química de las muestras.

#### **III.4.3. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).**

Las imágenes de alta resolución de los polvos de los materiales, se obtuvieron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL, JEM-2010F (Tokyo, Japan). Las muestras fueron preparadas por dispersión de los polvos en agua deionizada formando suspensiones muy diluidas.

#### **III.4.4. Absorción Atómica.**

Los iones de Ca y Si disueltos en el fluido fisiológico simulado, fueron analizados mediante el un equipo de absorción atómica Analyst 400 (Perkin Elmer), las muestras fueron preparadas con lantano 2% (inhibidor) y HNO<sub>3</sub> 2% (conservador) con estándares de 2.0 ppm, 5.0 ppm de Ca.

#### **III.4.5. Colorimetría.**

La concentración del ion de fosforo disuelto en el fluido fisiológico simulado fue analizado por medio de un equipo de colorimetría, thermo Scientific (Genesys 20), en donde se realizó una curva de calibración con 2, 4, 6, 8, y 10 ppm de fosforo.

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

#### IV.1. Evaluación de las Propiedades Bioactivas

Se evaluó la bioactividad de los tres materiales, formándose 4 tabletas de cada material y, analizando la nueva capa de apatita formada sobre la superficie de los materiales densos, después de ponerse en contacto con 40 mililitros de la SBF durante 1, 2, 3 y 4 semanas. Cada semana se separó un lote, extrayendo el material denso de la solución, para poder así analizar por separado nuestro biomaterial denso, de la solución.

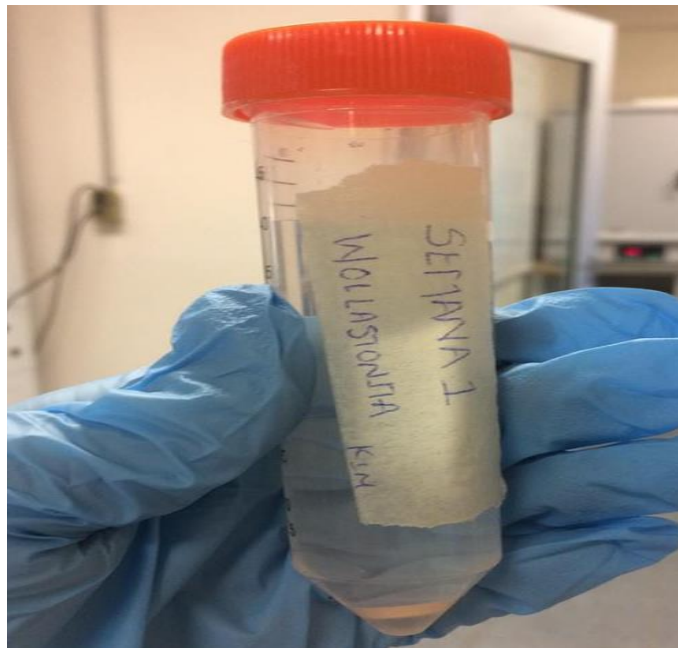


Figura 9. Imagen de material inmerso en SBF.

El efecto de la interacción de los materiales con el sistema fisiológico simulado, se analizó evaluando las características de las capas formadas sobre de los materiales. La evaluación de la morfología y composición de las capas, se evaluó mediante SEM/EDS, utilizando un microscopio electrónico de barrido Philips, modelo XL30 ESEM. Para la determinación de los cambios en la concentración de los iones Ca, P y Si, así como los cambios de pH de la solución SBF durante el período de inmersión de las muestras, se utilizaron los equipos de absorción atómica *A Analyst 400* (Perkin Elmer) y colorimetría *Thermo Scientific* (Genesis 20).

#### IV.1.1. Resultados Microscopia Electrónica de Transmisión

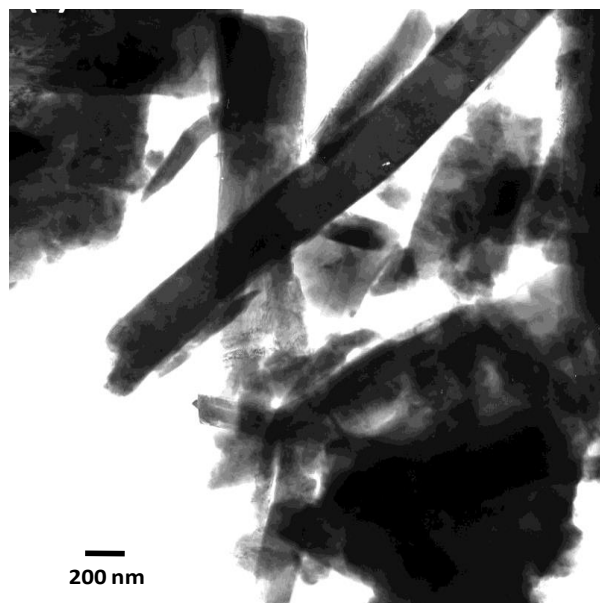


Figura 10. Microscopia electrónica de transmisión de wollastonita NYAD M-200.

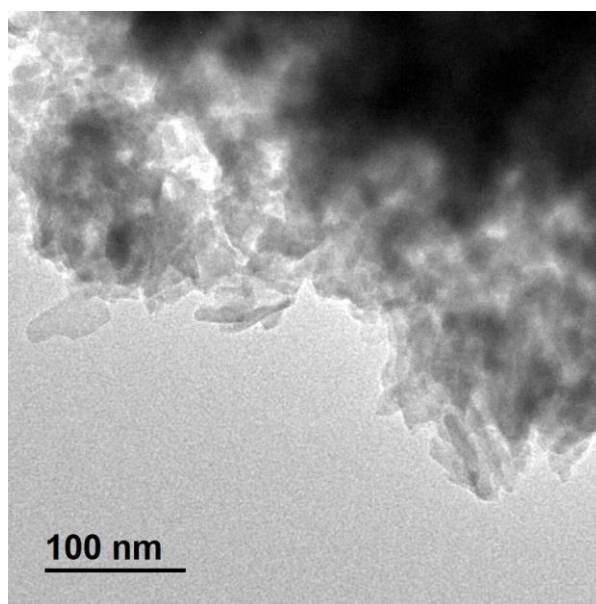


Figura 11. Microscopia electrónica de transmisión del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmerso en agua, tratado térmicamente hasta 350 ° C.

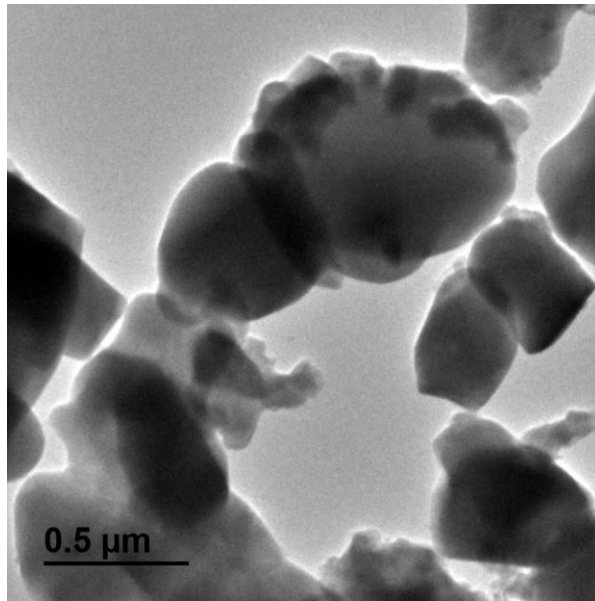


Figura 12. Microscopía electrónica de transmisión del xerogel seco, obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmerso en agua, tratado térmicamente hasta 750°C.

La figura 10 muestra las imágenes de microscopio electrónico de transmisión, de las superficies de los polvos de wollastonita NYAD M-200, en la cual se puede observar la morfología típica de la wollastonita en forma acicular.

Las figura 11 y 12, muestran la imagen de microscopio electrónico de transmisión del Xerogel seco, formulado para producir hidroxiapatita, a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua tratado térmicamente hasta 350°C y 750°C respectivamente. La figura 11, muestra la morfología típica de la hidroxiapatita en sus primeras etapas de cristalización, la cual no muestra una morfología completamente definida. Por otra parte la figura 12, muestra una hidroxiapatita completamente cristalizada y con una morfología totalmente definida.

#### IV.1.2. Resultados Microscopia Electrónica de Barrido

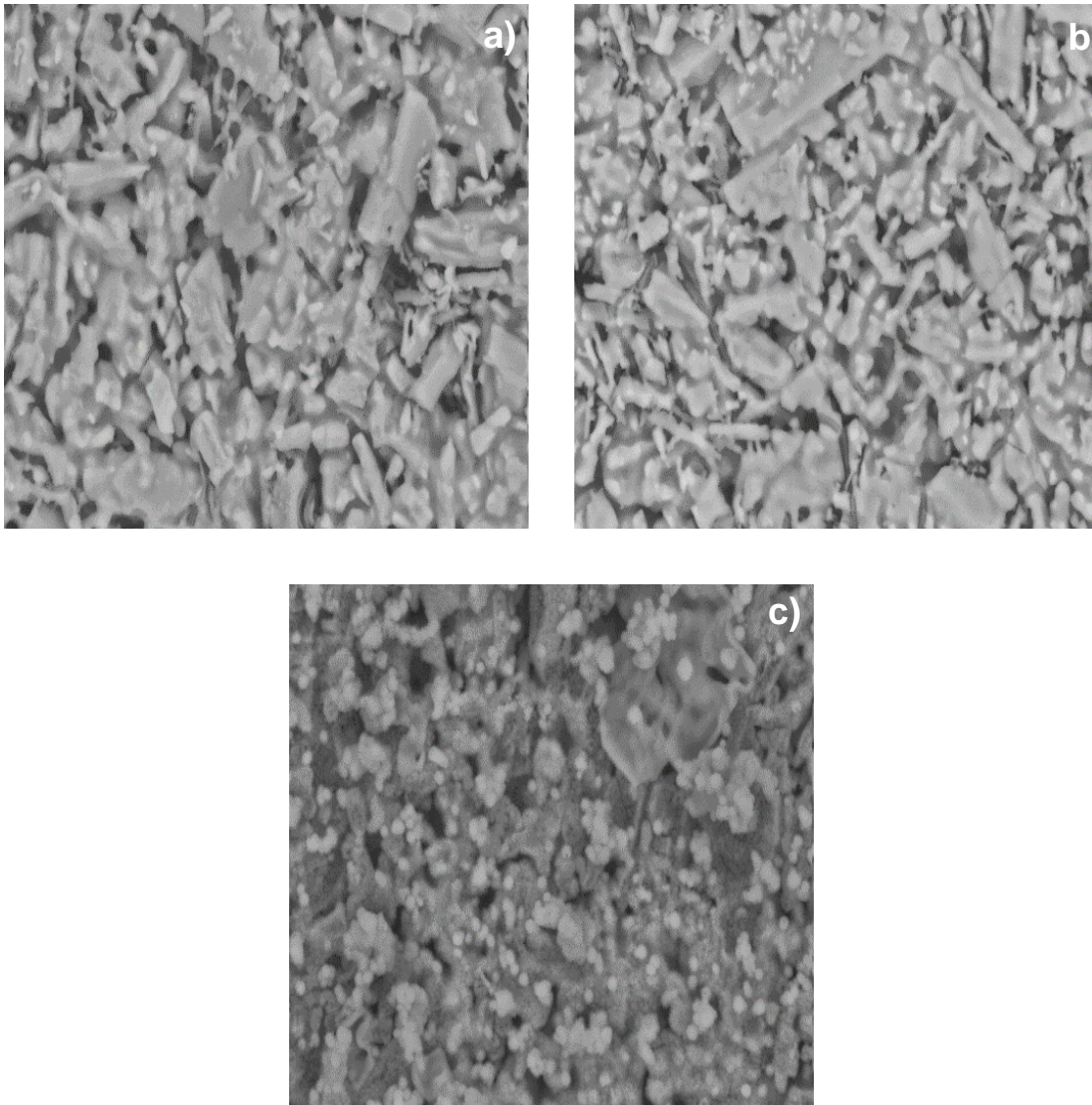


Figura 13. Imágenes de microscopia electrónica de barrido de los materiales sinterizados de wollastonita a 1200°C y 220 Mpa inmersos en la solución SBF. a) 1 semana de inmersión en SBF, b) 2 semanas de inmersión en SBF, c) 3 semanas de inmersión en SBF.



La figura 13 muestra las imágenes de microscopio electrónico de barrido a una escala de  $20\mu\text{m}$ , de las superficies de wollastonita sinterizados a  $1200^{\circ}\text{C}$  y con una carga de prensado de 220 Mpa. Los materiales de wollastonita fueron sumergidos durante 1, 2 y 3 semanas en fluidos fisiológicos simulados (SBF).

Las imágenes muestran como en la superficie de los sinterizados se observa la presencia de una capa superficial, formada por un nuevo material, en el cual se pueden observar pequeñas partículas esféricas.

En la tercer semana de inmersión, el material muestra el mayor crecimiento de esta nueva capa, denominada “apatita neoformada”, [5], por presentar características muy semejantes a las apatitas biológicas, formadas en los materiales bioactivos al ponerse en contacto con fluidos fisiológicos.

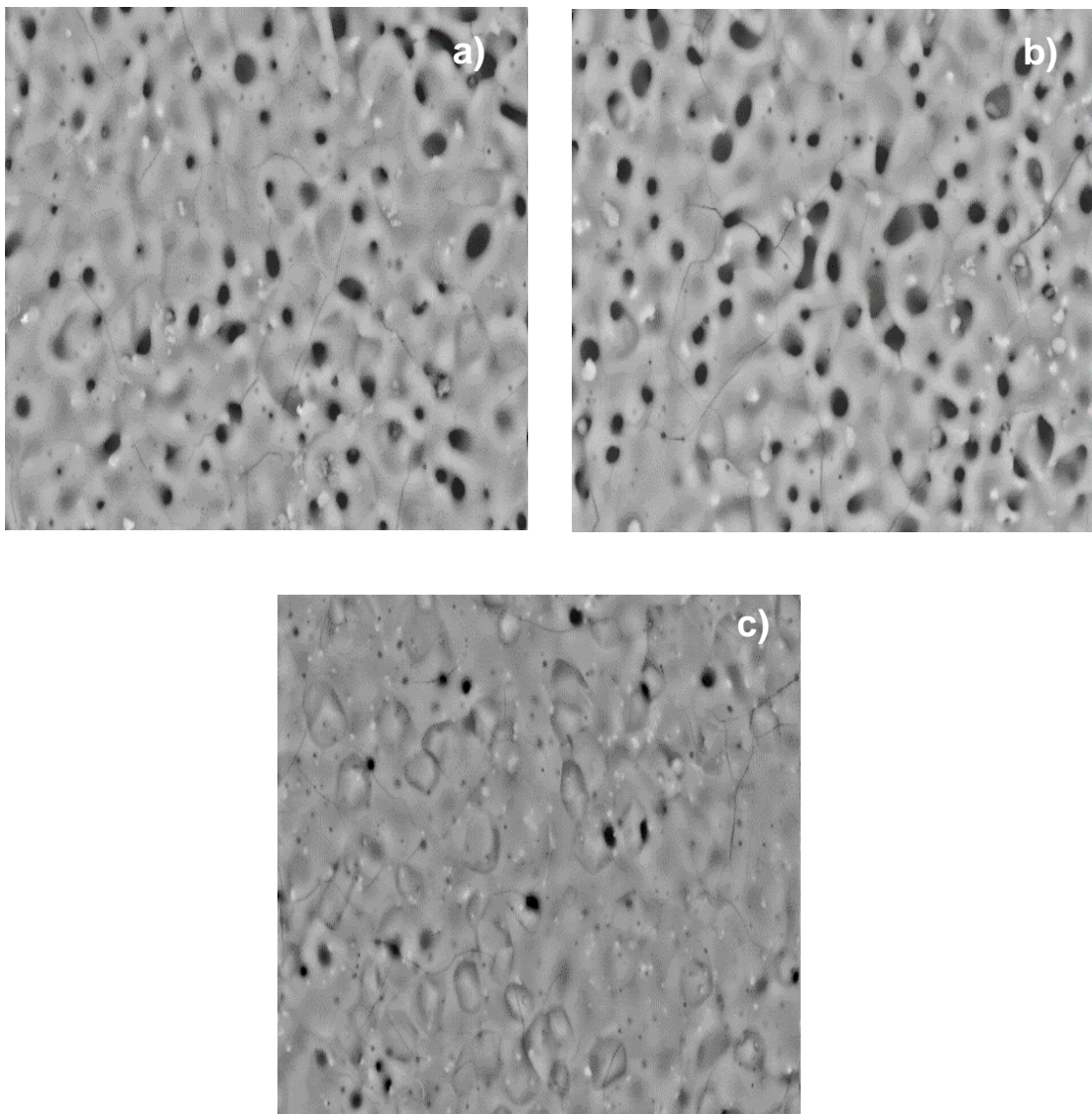


Figura 14. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los materiales de hidroxiapatita, tratados térmicamente hasta 350°C y sinterizados hasta 1200°C y 220 Mpa, inmersos en solución SBF. a) 1 semana de inmersión en SBF, b) 2 semanas en SBF, c) 3 semanas en SBF.

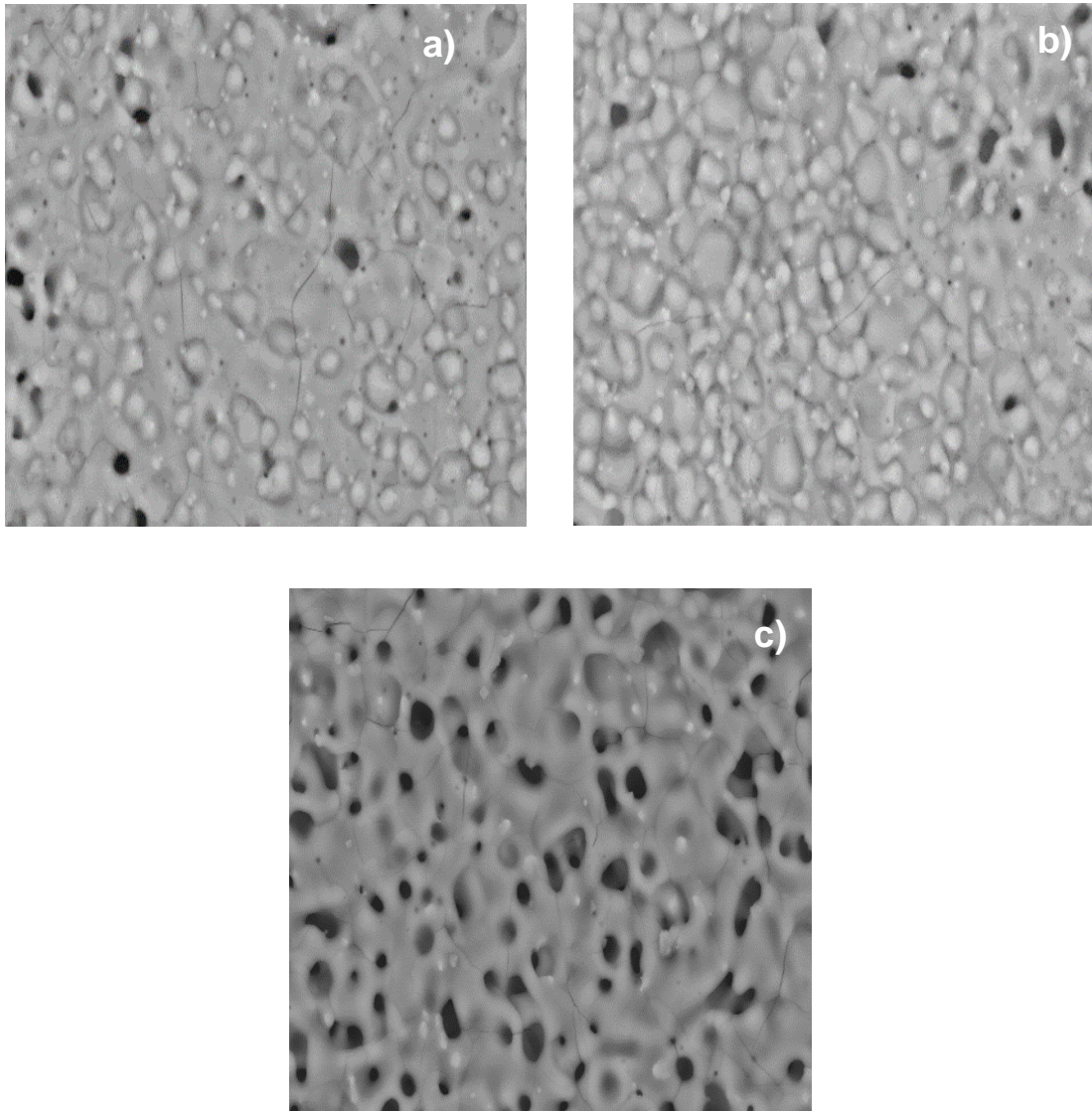


Figura 15. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los materiales de hidroxiapatita tratados térmicamente hasta 750°C y sinterizados hasta 1200°C y 220 Mpa inmersos en solución SBF. a) 1 semana de inmersión en SBF, b) 2 semanas en SBF, c) 3 semanas en SBF.

La figura 14 muestra las imágenes de microscopio electrónico de barrido a una escala de 20µm de los materiales de hidroxiapatita, tratados térmicamente hasta 350°C y sinterizados a 1200°C y 220 Mpa, después de ser inmersos en 1, 2 y 3 semanas en solución SBF, en la figura se puede observar un material denso con cierto grado de porosidad la cual presenta diferentes tamaños, estos poros son de gran importancia para la formación de la nueva capa de apatita.

La figura 15, muestra las imágenes de microscopio electrónico de barrido a una escala de 20µm, de los materiales de hidroxiapatita tratados térmicamente hasta 750°C y sinterizados a 1200°C y 220 Mpa, después de ser inmersos en 1, 2 y 3 semanas en solución SBF, en esta imagen se aprecia de nueva cuenta un material denso, con ciertas formas granulares, así mismo, se observan ciertas grietas en la superficie del material, así como poros de tamaños variables, aunque en menor cantidad comparado con los materiales de hidroxiapatita tratados térmicamente hasta 350°C.

### IV.1.3. Resultados Espectroscopia de Dispersión de Energía

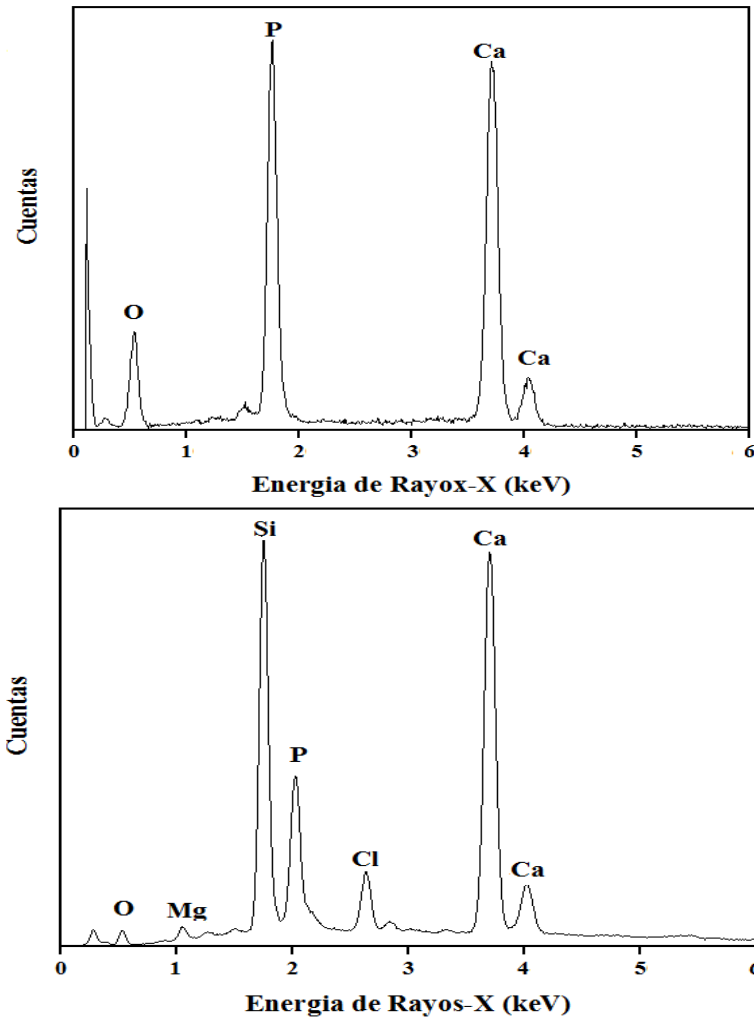


Figura 16. Imagen de espectroscopia de dispersión de energía de  $\beta$  Wollastonita, a) antes del baño fisiológico y b) después del baño fisiológico.

La figura 16, muestra los resultados de espectroscopia de dispersión de energía de los materiales de  $\beta$  wollastonita, antes de la inmersión en el baño fisiológico simulado, de la cual se pueden observar los elementos constituyentes de la  $\beta$  wollastonita, dando certeza de la pureza del material después del proceso de sinterización. De la misma forma, después de la inmersión por un periodo de 3 semanas en fluidos fisiológicos simulados, se puede apreciar la presencia de un fosforo a 2.013 keV, sumado a los elementos constituyentes de la wollastonita.

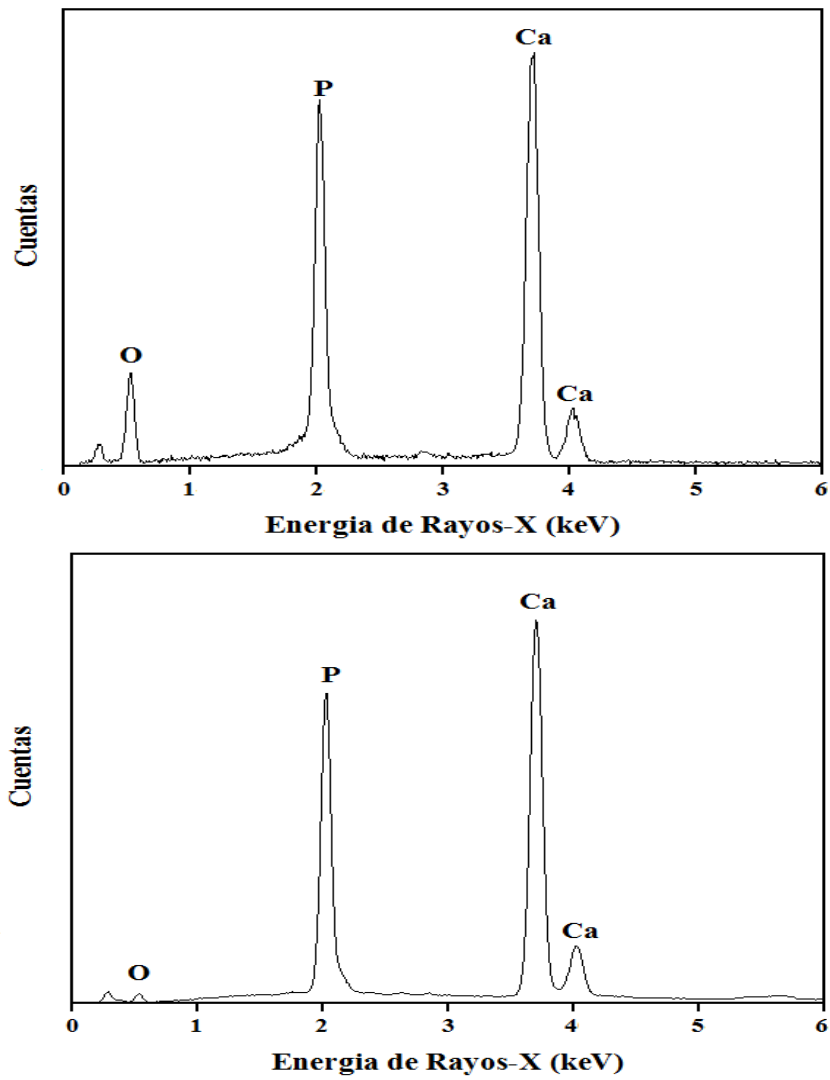


Figura 17. Imagen de espectroscopia de dispersión de energía hidroxapatita 350°C a) antes del baño fisiológico y b) después del baño fisiológico.

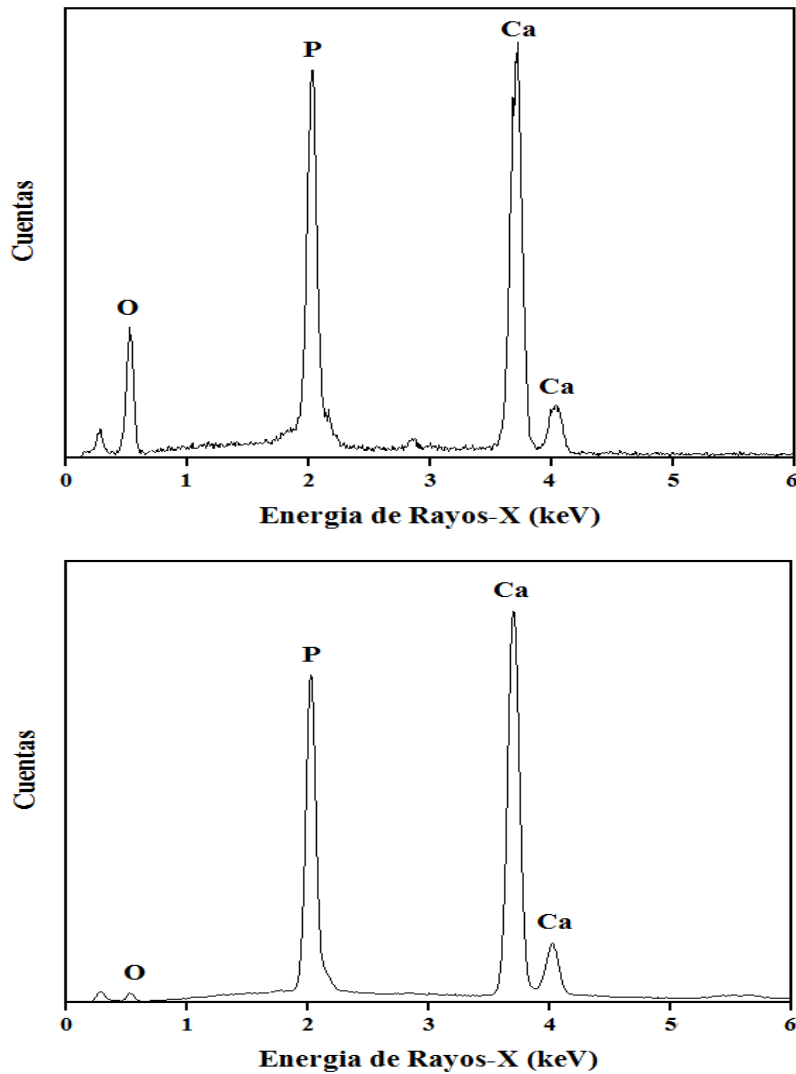


Figura 18. Imagen de espectroscopia de dispersión de energía hidroxiapatita 750°C a) antes del baño fisiológico y b) después del baño fisiológico.

La figura 17 y 18, muestran los resultados de espectroscopia de dispersión de energía de los materiales de hidroxiapatita, tratados térmicamente hasta 350°C y 750°C respectivamente. En las cuales podemos observar los elementos constituyentes de la hidroxiapatita, dando certeza de la pureza de los materiales, tanto en el proceso de síntesis, como el de sinterización. Los materiales fueron inmersos por un periodo de 3 semanas en fluido fisiológico simulado (SBF), resultando con la presencia de los elementos constituyentes de un fosfato de calcio demostrando un material totalmente puro.

**IV.1.4. Comportamiento del pH y la solubilidad de los iones Ca, P y Si al interactuar los materiales densos con el fluido fisiológico simulado (SBF).**

Tabla IV. Resultado del consumo de los iones de la SBF en contacto con materiales densos de  $\beta$  wollastonita.

<i>Wollastonita <math>\beta</math></i>	<i>Fosforo</i>	<i>Calcio</i>	<i>Silicio</i>	<i>pH</i>
<i>Semana</i>	<i>PPM</i>	<i>PPM</i>	<i>PPM</i>	
<i>0</i>	<i>30</i>	<i>100</i>	<i>0</i>	<i>7.40</i>
<i>1</i>	<i>0</i>	<i>149.40</i>	<i>28.54</i>	<i>7.86</i>
<i>2</i>	<i>0.04</i>	<i>236.70</i>	<i>44.02</i>	<i>8.08</i>
<i>3</i>	<i>0.04</i>	<i>325.75</i>	<i>54.84</i>	<i>8.30</i>
<i>4</i>	<i>0</i>	<i>434.55</i>	<i>61.46</i>	<i>8.58</i>



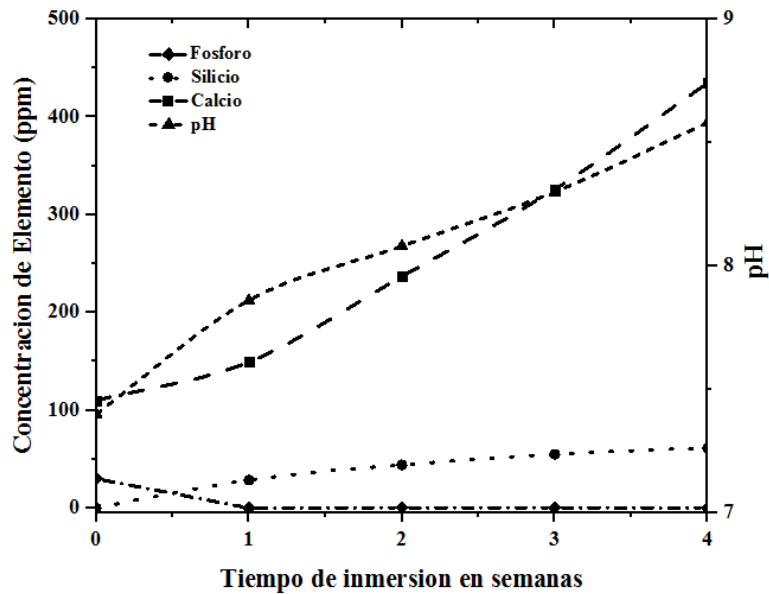


Figura 19. Comportamiento del pH y la variación de la concentración de Ca, P y Si, al interactuar los materiales densos de  $\beta$ -wollastonita, con el fluido fisiológico simulado (SBF), durante un periodo de inmersión de 1, 2, 3 y 4 semanas.

La figura 19, muestra la variación en la concentración de Ca, P y Si, así como los cambios en los valores de pH en el fluido fisiológico simulado (SBF), como consecuencia de la inmersión de los materiales densos de  $\beta$ -wollastonita en esta solución durante un periodo de 1, 2, 3 y 4 semanas. El sinterizado de  $\beta$ -wollastonita, presenta un aumento en Si hasta alcanzar las 61 ppm y estabilizándose, mientras que el P presenta un decremento durante el periodo de inmersión en SBF, con respecto al Ca, se observa un incremento hasta alcanzar las 434 ppm, el pH aumenta alcanzando valores superiores a los 8.5.

Tabla V. Resultado del consumo de los iones de la SBF en contacto con materiales densos de hidroxiapatita 350°C.

<i>Hidroxiapatita 350 °C</i>	<i>Fosforo</i>	<i>Calcio</i>	<i>Silicio</i>	<i>pH</i>
<i>Semana</i>	<i>PPM</i>	<i>PPM</i>	<i>PPM</i>	
<i>0</i>	<i>30</i>	<i>100</i>	<i>0</i>	<i>7.40</i>
<i>1</i>	<i>2.56</i>	<i>76.60</i>	<i>0</i>	<i>7.54</i>
<i>2</i>	<i>1.23</i>	<i>59.95</i>	<i>0</i>	<i>7.55</i>
<i>3</i>	<i>1.45</i>	<i>60.45</i>	<i>0</i>	<i>7.56</i>
<i>4</i>	<i>0.08</i>	<i>49.70</i>	<i>0</i>	<i>7.58</i>

Tabla VI. Resultado del consumo de los iones de la SBF en contacto con materiales densos de hidroxiapatita 750°C.

<i>Hidroxiapatita 750 °C</i>	<i>Fosforo</i>	<i>Calcio</i>	<i>Silicio</i>	<i>pH</i>
<i>Semana</i>	<i>PPM</i>	<i>PPM</i>	<i>PPM</i>	
<i>0</i>	<i>30</i>	<i>100</i>	<i>0</i>	<i>7.40</i>
<i>1</i>	<i>2.79</i>	<i>80,05</i>	<i>0</i>	<i>7.58</i>
<i>2</i>	<i>3,46</i>	<i>88,65</i>	<i>0</i>	<i>7.58</i>
<i>3</i>	<i>3,31</i>	<i>90.05</i>	<i>0</i>	<i>7.53</i>
<i>4</i>	<i>2,94</i>	<i>85,55</i>	<i>0</i>	<i>7.44</i>

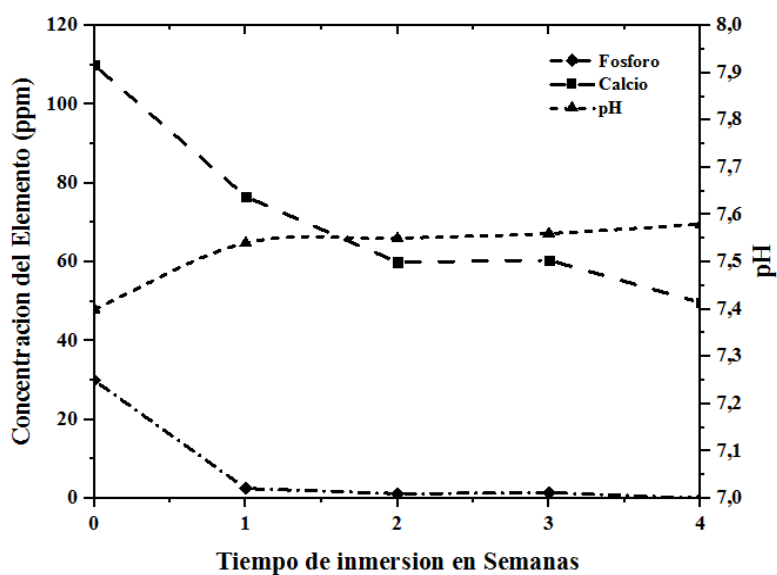


Figura 20. Comportamiento del pH y la variación de la concentración de Ca y P al interactuar los materiales densos de hidroxiapatita, tratados térmicamente hasta 350°C con el fluido fisiológico simulado (SBF), durante un periodo de inmersión de 1, 2, 3 y 4 semanas.

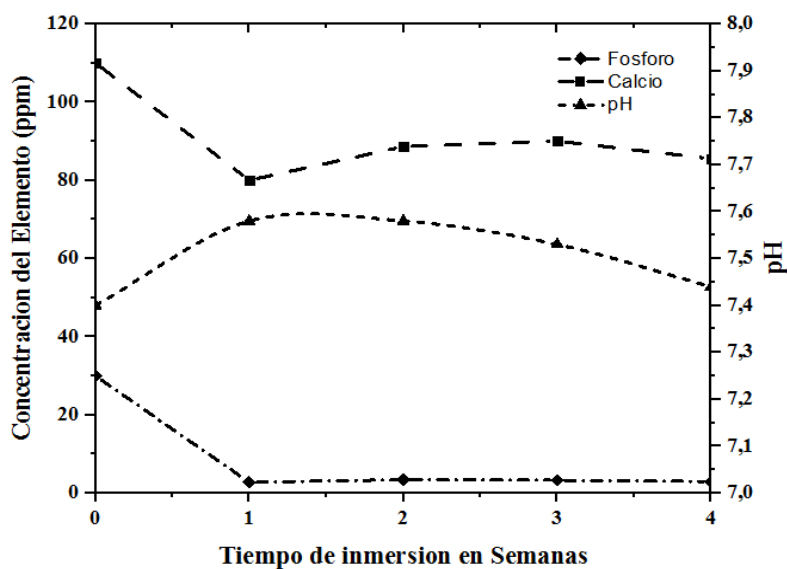


Figura 21. Comportamiento del pH y la variación de la concentración de Ca y P al interactuar los materiales densos de hidroxiapatita, tratados térmicamente hasta 750°C con el fluido fisiológico simulado (SBF), durante un periodo de inmersión de 1, 2, 3 y 4 semanas.

Las figuras 20 y 21, muestran los cambios en el pH, así como, la variación de Ca y P en el fluido fisiológico simulado SBF, como consecuencia de la inmersión de los materiales densos de hidroxiapatita, tratada térmicamente hasta los 350°C y 750°C respectivamente en esta solución, durante un periodo de 1, 2, 3 y 4 semanas. Con respecto a la hidroxiapatita tratada térmicamente hasta los 350°C, podemos observar un aumento del pH desde las primeras semanas hasta alcanzar los 7.58, con respecto al Ca, este disminuye hasta los 49.7 ppm tendiendo a estabilizarse, el P disminuye desde la semana 1 hasta alcanzar valores menores a 1 ppm. Con respecto a la hidroxiapatita tratada térmicamente hasta 750°C, los valores de pH aumentan en las primeras 2 semanas hasta 7.58, para finalmente disminuir hasta alcanzar un valor de 7.44, con respecto al Ca este disminuye hasta estabilizarse en 85.5 ppm, el P tiende a disminuir estabilizándose en valores inferiores a 3 ppm. Lo anterior implica que la hidroxiapatita tratada térmicamente hasta 350°C, es más bioactiva comparada con la hidroxiapatita tratada térmicamente hasta 750°C en solución SBF.

## **V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

Las conclusiones más importantes de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación indican en los puntos siguientes:

- Se sintetizó hidroxiapatita estequiométrica mediante la ruta sol-gel utilizando como agentes precursores nitrato de calcio y fosfato de amonio, el cual consiste en un método muy sencillo y práctico, el tiempo para producir el xerogel activo es relativamente corto mismo que dará lugar a los materiales densos.
- Se sinterizaron materiales densos de  $\beta$ -wollastonita, hidroxiapatita 350°C, así como hidroxiapatita 750°C, con una temperatura de sinterización de 1200°C y una carga de prensado de 220 MPa.
- El análisis de bioactividad de los materiales densos, mediante su interacción con el fluido fisiológico simulado (SBF), demostró la formación de una capa de apatita neoformada, sobre la superficie de los materiales, similar a las apatitas biológicas que componen el tejido óseo.
- Mediante las técnicas SEM-EDS, Absorción Atómica y Colorimetría, se demostró la formación de una capa de apatita neoformada, mediante un mecanismo de disolución-precipitación. En los tres materiales, el pH se mantiene relativamente estable.
- Los resultados de los materiales con  $\beta$ -wollastonita en el proceso de formación de apatita sobre la superficie de los materiales, resultó más rápida en relación con la superficie de los materiales con hidroxiapatita 350°C y 750°C. A su vez, los materiales con hidroxiapatita 350°C presentaron una mayor solubilidad en relación con los materiales de hidroxiapatita 750°C. Esto debido a que la hidroxiapatita 350°C se

encuentran en sus primeras etapas de cristalización, en relación con la hidroxiapatita 750°C que se encuentran totalmente cristalizada.

- Los materiales sinterizados presentan cierto grado de porosidad indicando que los materiales producidos no son totalmente densos. Este grado de porosidad, es importante para asegurar la eficiente integración de estos materiales con el tejido óseo, lo cual da lugar a mejores propiedades bioactivas.

Entre las recomendaciones más destacadas, para complementar esta investigación se encuentran las siguientes:

- Desarrollar un estudio de las propiedades biológicas de estos materiales realizando pruebas de hemólisis.
- Desarrollar un estudio de biocompatibilidad para estos materiales mediante pruebas de citotoxicidad.
- Desarrollar un análisis cuantitativo de la porosidad en los materiales, y determinar su relación con las propiedades mecánicas.

## **VI. BIBLIOGRAFIA**



1. R. González , F. Blardoni , H. Maestre, O. Pereda , E. Pancorbo , M. Cienaga, Long-termsresults of theCorallinePorousHydroxyapatite HAP-200 as bone implant's biomaterial in Orthopedics and Traumatology RevistaCienciasBiológicas CENIC, 2001.
2. B. Ratner and A. Hoffman, "Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine". Academic Press. 1996. 473 p.
3. L. Boskey-Adele, "Amorphous Calcium Phosphate: The Contention of Bone". Journal of Dental Research; Houston; Aug 1997. Vol. 76 No 8 p. 1433-1439.
4. B. Harry-Skinner "Diagnostico y Tratamiento en Ortopedia. Manual Moderno", 2da edición, México D.F. 2004
5. M.A. Encinas-Romero, S. Aguayo-Salinas, S.J. Castillo, F.F. Castillon-Barraza, and V.M. Castano, "Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite-Wollastonite Composite Powders by Sol-Gel Processing," Int J. Appl. Ceram. Technol., 5 [4] 401–411 (2008).
6. A. Ibañez, F. Sandoval. La wollastonita: propiedades, síntesis y aplicaciones ceramicas. En Instituto de ceramica y vidrio(349). Madrid, España: BOL. SOC. ESP. CERAM. VIDR. 1993
7. M.A. Encinas-Romero, "Síntesis y Caracterización de Compositos de Hidroxiapatita-Wollastonita, Preparados Mediante la Técnica Sol-Gel," Tesis Doctoral, Universidad de Sonora. Hermosillo Sonora, Mexico.
8. M. García-Garduño, J. Reyes-Gasga, "La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica", Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, vol. 9, núm. 2, diciembre, pp. 90-95, Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México. (2006)
9. T. Kokubo and H. Takadama, "How Useful is SBF in Predicting *In vivo* Bone Bioactivity," *Biomaterials*, 27 2907-2915 (2006).

10. U.S. Geological Survey and U.S. Department of the Interior, "Wollastonite- A Versatile Industrial Mineral," FS-002-01 Booklet, USGS Science for a changing world, Denver, CO, 2001.
11. Ochoa-Landín, Lucas; Pérez-Segura, Efrén; Del Río-Salas, Rafael; y Valencia-Moreno Martín, Depósitos minerales de Sonora, México, in Calmus, Thierry, ed., Panorama de la geología de Sonora, México: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geología, Boletín 118, cap. 9, p. 320. (2011)
12. Gustavo Duffo, Materiales y Materias Primas "Biomateriales" Cap 8. 9-10 Republica Argentina (2011)
13. Maria Cristina Piña. «Los biomateriales y sus aplicaciones» Revista: "Casa del tiempo" 28, 55-58.
14. J. Peralta-Haley "Caracterización de Biocompositos Wollastonita/Hidroxiapatita en Fluidos Fisiológicos Simulados". Tesis Maestría, Universidad de Sonora. Hermosillo Sonora, México. (2016).
15. K.C. Dee, D.A. Puleo, R. Bizios. An Introduction To Tissue-Biomaterials Interactions. WILEY-LISS, New Jersey. 1.1:1 - 2, 1.3: 6 – 11. (2002).
16. M. Vallet- Regí, "Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos" Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Universidad Complutense. 28040, Madrid.
17. J. Gonzalez-Hernandez, J. F. Perez-Robles, "Vidrios SiO<sub>2</sub> nanocompuestos preparados por sol-gel: revisión. Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados IPN, Unidad Queretaro, (2000).
18. A. Duran, Sol-Gel: Un nuevo camino hacia el vidrio Instituto de Cerámica y Vidrio, C.S.I.C. Arganda del Rey, Madrid (1986).
19. Harry B. Skinner "Diagnostico y Tratamiento en Ortopedia. Manual Moderno", 2da edición, México D.F. 2004.

