



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

---

## **DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

### **POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

#### **EVALUACIÓN DE PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE BIOMATERIALES SINTERIZADOS DE WOLLASTONITA NATURAL Y BIOCOPÓSITOS DE HIDROXIAPATITA/WOLLASTONITA, PREPARADOS POR DIFERENTES RUTAS SOL- GEL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**PRESENTA:**

**M.C. LUIS ALBERTO NÚÑEZ RODRÍGUEZ**

**DIRECTOR: MARTIN ANTONIO ENCINAS ROMERO**

**Hermosillo, Sonora**

**Enero, 2021**

# 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


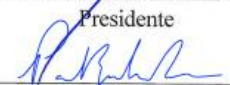
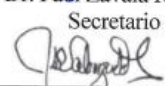

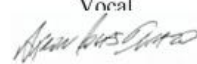
# UNIVERSIDAD DE SONORA

## APROBACION DEL JURADO

de la tesis presentada por:

**Luis Alberto Núñez Rodríguez**

Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos la han encontrado satisfactoria.

<u>29/01/2021</u> Fecha	 Dr. Martín Antonio Encinas Romero Presidente
<u>29/01/2021</u> Fecha	 Dr. Paul Zavala Rivera Secretario
<u>29/01/2021</u> Fecha	 Dr. Jesús Leobardo Valenzuela García Vocal
<u>29/01/2021</u> Fecha	 Dr. Agustín Gómez Álvarez Vocal
<u>29/01/2021</u> Fecha	 Dr. Aarón de Jesús Rosas Durazo Sinodal Externo



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

# UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ingeniería

Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química

## AUTORIZACIÓN DEL EXAMEN DE GRADO

21 de Enero de 2021

Por medio de la presente se hace constar que el estudiante **LUIS ALBERTO NÚÑEZ RODRÍGUEZ**, ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de grado del programa de Doctorado en Ciencias de la ingeniería.

**DR. ABRAHAM ROGELIO MÁRTIN GARCÍA**  
**COORDINADOR DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA**  
**INGENIERÍA: INGENIERÍA QUÍMICA**

## RESUMEN

Uno de los materiales más utilizados en la cirugía de tejido óseo es la hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  debido a que presenta una composición química similar a los tejidos duros del cuerpo (huesos y dientes), así como también, presenta propiedades biológicas de gran interés para implantes óseos. Sin embargo, la hidroxiapatita muestra una baja resistencia mecánica, tenacidad a la fractura y resistencia a la fatiga lo que restringe su uso para regiones del cuerpo humano sin situaciones de carga o estrés. Uno de los métodos para solucionar estas dificultades es la incorporación de una fase de refuerzo con buenas propiedades mecánicas y que no reduzca la buena biocompatibilidad ya existente en el material. Los materiales cerámicos son ideales para realizar este compósito, la wollastonita  $\text{CaSiO}_3$  ha sido utilizada como biomaterial debido a su buena bioactividad y propiedades mecánicas. En el presente trabajo, se sintetizaron materiales de hidroxiapatita-wollastonita utilizando dos rutas sol-gel diferentes. Ruta I utilizando acetato de calcio  $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ , y trietil fosfato  $\text{PO}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ , como agentes precursores de hidroxiapatita y wollastonita natural de alta pureza. Ruta II utilizando nitrato de calcio  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y fosfato de amonio  $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$  como agentes precursores de hidroxiapatita. Los polvos de los materiales sintetizados fueron prensados a 220 MPa y sinterizados a  $1200^\circ\text{C}$  durante 5 horas con el objetivo de producir materiales densos. Los materiales fueron caracterizados por análisis térmico diferencial (DTA), análisis termogravimétrico (TGA), difracción de rayos-X (XRD), espectroscopia infrarroja de transformadas de Fourier (FTIR), espectroscopia de dispersión de energía (EDS), microscopia electrónica de barrido (SEM), y microscopia electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopia de absorción atómica (EAA). Para evaluar las propiedades biológicas de los materiales se realizaron pruebas de bioactividad, mediante el contacto con una solución de fluido fisiológico simulado (SBF), que presenta una carga iónica similar a la del plasma sanguíneo, a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$  bajo condiciones estáticas. Los resultados mostraron la formación de una capa de apatita neoformada sobre la superficie de los materiales, después de estar en contacto por un periodo de 1, 2 y 3 semanas con el fluido fisiológico simulado.

(SBF). Destacando el compósito  $\beta$  wollastonita-hidroxiapatita carbonatada, obteniendo una mayor velocidad de disolución y consecuente precipitación durante el proceso de formación de la nueva capa de apatita sobre la superficie del material, mostrando una mayor bioactividad en comparación con los otros materiales evaluados.

Todos los materiales sinterizados presentaron cierto grado de porosidad, indicando que los materiales no son totalmente densos. Este grado de porosidad es importante para asegurar la eficiente integración de estos materiales con el tejido óseo, dando lugar a propiedades bioactivas más eficientes.

Se determinó el porcentaje de hemólisis de los materiales de acuerdo al protocolo (ASTM) E2524-08. Los materiales estuvieron en contacto directo con fluido sanguíneo de un adulto sano, no fumador colectado en tubos Vacutainer con heparina para prevenir coagulación. La determinación se realizó a través de varias concentraciones diferentes: 2, 4 y 6 mg/mL de cada material. Los resultados revelaron que la hidroxiapatita carbonatada Tipo-B es hemolítica, sobrepasando los límites máximos de la prueba (5% de hemólisis). Por otro lado, los materiales hidroxiapatita 350 y 750 obtuvieron los mejores resultados en el porcentaje de hemólisis, menos del 1%.

## ABSTRACT

One of the most used materials in bone tissue surgery is hydroxyapatite,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  because it has a chemical composition similar to the hard tissues of the body (bones and teeth), as well as having biological properties of great interest for bone implants. However, hydroxyapatite shows low mechanical resistance, fracture toughness and fatigue resistance, which restricts its use for regions of the body without stress or load situations. One of the methods to solve these difficulties is the incorporation of a reinforcement phase with good mechanical properties and that does not reduce the good biocompatibility already existing in the materials. Ceramic materials are ideal for making this composite, wollastonite  $\text{CaSiO}_3$  has been used as a biomaterial due to its good bioactivity and mechanical properties. In the present work, hydroxyapatite-wollastonite materials were synthesized using two different sol-gel routes. Route I using calcium acetate  $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ , and triethyl phosphate  $\text{PO}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ , as precursors of hydroxyapatite and high purity natural wollastonite. Route II using calcium nitrate  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  and ammonium phosphate  $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$  as hydroxyapatite precursor agents. Powders from the synthesized materials were pressed at 220 MPa and sintered at 1200°C for 5 hours in order to produce dense materials. The materials were characterized by differential thermal analysis (DTA), thermogravimetric analysis (TGA), X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS), scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). To evaluate the biological properties of the materials, bioactivity tests were performed, by contact with a simulated body fluid solution (SBF), which has a ionic charge similar to that of blood plasma, at a temperature of 37°C under static conditions. The results showed a formation of a newly formed apatite layer on the surface of the materials, after being in contact for a period of 1, 2 and 3 weeks with the simulated body fluid (SBF). Highlighting the  $\beta$ -wollastonite-carbonated hydroxyapatite composite, obtaining a higher dissolution speed and consequent precipitation during the process of formation of the new apatite layer on the surface material, showing grater bioactivity compared to the

other materials evaluated. All the sintered materials presented a certain degree of porosity, indicating that the materials are not totally dense. This degree of porosity is important to ensure the efficient integration of these materials with the bone tissue, leading to more efficient bioactive properties.

The percentage of hemolysis of the materials was determinate according to protocol (ASTM) E2524-08. The materials were in direct contact with blood fluid from a healthy and non-smoking adult and collected in Vacutainer test tubes with heparin to prevent coagulation. The determination was carried out through several different concentrations 2, 4 and 6 mg/mL of each material. The results revealed that Type-B carbonated hydroxyapatite is hemolytic, exceeding the maximum limits of the test (5% hemolysis). On the other hand, the hydroxyapatite materials 350 and 750 obtained the best results in the percentage of hemolysis, less than 1%.



---

## DEDICATORIA

*A mi esposa Martha y mi hija Ana Luisa.*



---

---

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION Y OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Objetivos.....</b>	<b>4</b>
1.2.1. Objetivo general.....	4
1.2.2. Objetivos específicos.....	4
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>5</b>
<b>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Generalidades.....</b>	<b>5</b>

---

---

2.1.1. Tejido óseo.....	5
2.2. Biomateriales.....	12
2.3. Biocerámicos.....	14
2.4. Hidroxiapatita.....	16
2.5. Wollastonita.....	18
2.6. Técnica Sol-Gel.....	23
2.7. Fluido Fisiológico Simulado (SBF).....	25
2.8. Análisis de la Bioactividad.....	27
2.9. Evaluación de las Propiedades Hemolíticas.....	28
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>30</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1. Síntesis de Hidroxiapatita Ruta I.....	30
3.2. Síntesis de Hidroxiapatita Ruta II.....	31
3.3. Wollastonita.....	31
3.4. Preparación de los Materiales Sinterizados.....	34
3.5. Preparación del Fluido Fisiológico Simulado (SBF).....	34
3.6. Evaluación de las Propiedades Bioactivas.....	36
3.7. Evaluación de la Solubilidad.....	36

---

---

<b>3.8. Análisis de las Propiedades Hemolíticas de los Materiales.....</b>	<b>37</b>
<b>3.9. Técnicas de Caracterización.....</b>	<b>38</b>
3.9.1. Análisis térmico.....	38
3.9.2. Difracción de rayos-X.....	38
3.9.3. Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier.....	38
3.9.4. Espectroscopia de dispersión de energía.....	38
3.9.5. Microscopia electrónica de barrido.....	39
3.9.6. Microscopia electrónica de transmisión.....	39
3.9.7. Espectroscopia de absorción atómica.....	39
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>40</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. Caracterización de los Materiales Antes del Proceso de Sinterización.....</b>	<b>40</b>
4.1.1. Análisis térmico.....	40
4.1.2. Difracción de rayos-X.....	45
4.1.3. Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier.....	52
4.1.4. Microscopia electrónica de barrido.....	56

---

---

4.1.5. Microscopia electrónica de transmisión.....	61
4.1.6. Distribución de tamaño de partícula.....	67
4.2. Evaluación de las Propiedades Bioactivas de los Materiales Sinterizados.....	69
4.3. Evaluación de la Solubilidad de los Materiales Sinterizados....	77
4.4. Evaluación de las Propiedades Hemolíticas.....	80
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>83</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>83</b>
5.1. CONCLUSIONES.....	83
5.1.1. Síntesis de materiales.....	83
5.1.2. Sinterización de los materiales.....	84
5.1.3. Evaluación de la bioactividad y solubilidad de los materiales.....	84
5.1.4. Evaluación de las propiedades hemolíticas.....	85
5.2. RECOMENDACIONES.....	86
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>87</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>87</b>

---

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura macroscópica de hueso (corte parcial de húmero).....	6
<b>Figura 2.</b> Tipos de células del tejido óseo.....	9
<b>Figura 3.</b> Histología del hueso compacto y del hueso esponjoso.....	11
<b>Figura 4.</b> Interrelación de las propiedades de los biomateriales..	13
<b>Figura 5.</b> Arreglo atómico de la hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ en una celda unitaria hexagonal.....	17
<b>Figura 6.</b> Estructura cristalina de la hidroxiapatita, que muestra las posibles posiciones de los iones carbonato.....	19
<b>Figura 7.</b> Estructura de la wollastonita, $\text{CaSiO}_3$ : a) Cadena de $\text{SiO}_4$ , b) Estructura cristalina, c) Ejes cristalográficos de una estructura triclinica.....	21
<b>Figura 8.</b> Micrografía de microscopio electrónico de barrido de la wollastonita, $\text{CaSiO}_3$ mostrando su forma acicular característica.....	22
<b>Figura 9.</b> Gráficos de ATG-ATD para la muestra de wollastonita, tratada térmicamente a partir de la temperatura ambiente hasta $1400^\circ\text{C}$ , a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ .....	42
<b>Figura 10.</b> Gráficos de ATG-ATD para el xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente desde la temperatura ambiente hasta $1000^\circ\text{C}$ a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ .....	43

---

<b>Figura 11.</b> Gráficos de ATG-ATD para el xerogel seco obtenido a partir de acetato de calcio y trietil fosfato inmersos en agua, tratado térmicamente desde la temperatura ambiente hasta 1000°C, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.....	44
<b>Figura 12.</b> Patrones de difracción de rayos-X de $\beta$ -wollastonita .....	47
<b>Figura 13.</b> Patrones de difracción de rayos-X de $\alpha$ -wollastonita .....	48
<b>Figura 14.</b> Patrones de difracción de rayos-X del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 350°C.....	49
<b>Figura 15.</b> Patrones de difracción de rayos-X del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 750°C.....	50
<b>Figura 16.</b> Patrones de difracción de rayos-X del xerogel seco obtenido a partir de acetato de calcio y trietil fosfato inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 1000°C, lavado con HCl 0.01 M y agua deionizada. (*) Hidroxiapatita, (c) Hidroxiapatita carbonatada .....	51
<b>Figura 17.</b> Espectros FT-IR de wollastonita natural NYAD-M200 Minera Roca Rodando, S. de R.L. de C. V.....	53
<b>Figura 18.</b> Espectros FT-IR del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 350°C.....	54
<b>Figura 19.</b> Espectros FT-IR del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 750°C.....	55
<b>Figura 20.</b> Microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectros EDS de wollastonita natural NYAD-M200 Minera Roca Rodando, S. de R.L. de C.V.....	57



---

<b>Figura 21.</b> Microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectros EDS del compuesto $\beta$ -wollastonita 50-50 hidroxiapatita carbonatada obtenida a partir de acetato de calcio y trietil fosfato inmersos en agua, tratados térmicamente hasta 1000°C y lavados con HCl 0.01 M y agua deionizada.....	58
<b>Figura 22.</b> Microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectros EDS del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 350°C.....	59
<b>Figura 23.</b> Microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectros EDS del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 750°C.....	60
<b>Figura 24.</b> Microscopia electrónica de transmisión de wollastonita natural NYAD-M200 Minera Roca Rodando, S. de R. L. de C.V.....	62
<b>Figura 25.</b> Microscopia electrónica de transmisión de hidroxiapatita carbonatada obtenida a partir de acetato de calcio y trietil fosfato inmersos en agua, tratados térmicamente hasta 1000°C y lavados con HCl 0.01 M y agua deionizada.....	63
<b>Figura 26.</b> Microscopia electrónica de transmisión (TEM) del compuesto $\beta$ -wollastonita 50-50 hidroxiapatita carbonatada producida a partir de acetato de calcio y trietil fosfato inmersos en agua, tratados térmicamente hasta 1000°C con HCl 0.01 M y agua deionizada.....	64
<b>Figura 27.</b> Microscopia electrónica de transmisión (TEM) del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 350°C.....	65
<b>Figura 28.</b> Microscopia electrónica de transmisión (TEM) del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 750°C.....	66

---

<b>Figura 29.</b> Distribución de tamaño de partícula de los materiales en forma de polvo, obtenidos a través del análisis por SEM (software particles metric).....	68
<b>Figura 30.</b> Imágenes de microscopio electrónico de barrido (A) y (B) y espectros EDS (C) y (D) del material $\beta$ -wollastonita sinterizado a 1200°C y 220 MPa, después de 1 y 3 semanas de inmersión en la solución SBF.....	72
<b>Figura 31.</b> Imágenes de microscopio electrónico de barrido (A) y (B) y espectros EDS (C) y (D) del material $\alpha$ -wollastonita sinterizado a 1200°C y 220 MPa, después de 1 y 3 semanas de inmersión en la solución SBF.....	73
<b>Figura 32.</b> Imágenes de microscopio electrónico de barrido (A) y (B) y espectros EDS (C) y (D) del material compuesto $\beta$ -wollastonita 50-50 hidroxiapatita carbonatada sinterizado a 1200°C y 220 MPa, después de 1 y 3 semanas de inmersión en la solución SBF.....	74
<b>Figura 33.</b> Imágenes de microscopio electrónico de barrido (A)-(D) y espectros EDS (E) y (F) del material hidroxiapatita 350 sinterizado a 1200°C y 220 MPa, después de 1 y 3 semanas de inmersión en la solución SBF.....	75
<b>Figura 34.</b> Imágenes de microscopio electrónico de barrido (A)-(D) y espectros EDS (E) y (F) del material hidroxiapatita 750 sinterizado a 1200°C y 220 MPa, después de 1 y 3 semanas de inmersión en la solución SBF.....	76
<b>Figura 35.</b> Variación de la concentración de Ca, P y Si y valores de pH en la solución SBF, cuando los materiales sinterizados a 1200°C y 220 MPa, fueron sumergidos durante 1, 2 y 3 semanas en esta solución SBF.....	79
<b>Figura 36.</b> Gráficas de los porcentajes de hemolisis de los materiales a 3 diferentes concentraciones 2, 4 y 6 mg/mL.....	82

---

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.**Concentración iónica del fluido fisiológico simulado (SBF) propuesto por Kokubo et al. (2006), comparada con el plasma sanguíneo humano .....26
- Tabla 2.**Composición química de wollastonita NYAD® M200, producida por la Minera Roca Rodando S. de R. L. de C.V.....32
- Tabla 3.**Propiedades típicas de wollastonita NYAD® M200, producida por la Minera Roca Rodando S. de R. L. de C.V.....33



# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1. Introducción

El hueso es el único tejido en el organismo 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. El principal avance se ha logrado en los países desarrollados, debido a la necesidad de proporcionar el tratamiento clínico a un gran número de pacientes. El incremento en las expectativas de vida y la obligación social de proveer una mejor calidad de vida es un factor crucial en estos progresos. Al incrementarse las expectativas de vida, el número de pacientes con problemas o lesiones óseas aumenta dramáticamente. La búsqueda de posibles soluciones a los problemas del tejido óseo ejerce una fuerte demanda de materiales capaces de sustituir o reparar los tejidos duros del organismo (huesos y dientes). El uso de materiales cerámicos en aplicaciones médicas, ha dado lugar a un interesante campo de estudio, en lo referente a la obtención de biomateriales para la producción de implantes [1].

Generalmente, los materiales artificiales implantados en defectos óseos son encapsulados por tejido fibroso, aislando a estos implantes del ambiente que rodea al hueso lesionado. Sin embargo, Larry Hench y colaboradores (1972), mostraron que una limitada clase de cerámicos, llamados biovidrios, tales como los encontrados en el sistema  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$ , podían enlazarse directamente al hueso vivo, evitando la interacción con el tejido fibroso [2].

A partir de esto, varios tipos de cerámicos, tales como hidroxiapatita, fosfatos  $\beta$ -tricálcicos y vitro-cerámicos conteniendo hidroxiapatita y wollastonita, son usados clínicamente como importantes sustitutos óseos, ya que también han demostrado uniones directas al hueso vivo [3].

A diferencia de otros fosfatos de calcio, la hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , es el fosfato de calcio, más parecido a la fase inorgánica de los huesos y los dientes, este biomaterial se descompone en menor grado bajo condiciones fisiológicas, es termodinámicamente muy estable, y es ampliamente utilizado como implante en cirugías de tejido duro debido a su similitud con los tejidos duros del organismo y su carácter bioactivo, lo cual permite a los implantes dar lugar a una unión directa con el tejido vivo, formando uniones fuertes con el hueso circundante [4-5].

Los sinterizados densos de hidroxiapatita, tienen varias aplicaciones en cirugía clínica, se utilizan en aplicaciones dentales y ortopédicas, como adyuvante en la colocación de implantes metálicos, para la reconstrucción del oído medio y en cirugía maxilofacial, entre otros. Sin embargo, las propiedades mecánicas de la hidroxiapatita sintética no son lo suficientemente eficientes para ser usadas en situaciones de carga, como dientes artificiales o huesos expuestos a grandes esfuerzos.

Una manera de resolver este problema es formar un compuesto con un material adecuado que permita reforzar y superar estas limitaciones mecánicas. De esta manera, se obtiene un material con propiedades optimizadas, sin perjuicio de su biocompatibilidad [4]. La Wollastonita,  $\text{CaSiO}_3$ , ha sido utilizada como fase de refuerzo en la fabricación de compósitos con el incremento de las propiedades mecánicas. También ha sido usada en aplicaciones médicas, en la fabricación de huesos artificiales y raíces dentales, debido a su buena biocompatibilidad y bioactividad [5].

Estudios recientes han demostrado que la wollastonita, además de eficientizar las propiedades mecánicas de los materiales, también influye directamente en la propiedades bioactivas de los mismos, generando capas de “apatita neoformada” más gruesas y densas [6], con lo cual se logran contactos más directas entre estos

materiales de implante y los tejidos vivos del organismo, así como eventualmente uniones más directas, producto de la osteoconducción, dando lugar a la formación de tejido óseo, mediante la actividad celular.

En este trabajo de investigación se realizó la síntesis de hidroxiapatita mediante dos técnicas sol-gel, y así mismo, producir biocompósitos de hidroxiapatita/wollastonita, utilizando wollastonita natural de alta pureza, como fase de refuerzo, para incrementar las propiedades mecánicas y bioactivas de la hidroxiapatita. Para finalmente, proponer un biomaterial o serie de biomateriales compuestos alternativos, completamente caracterizados desde el punto de vista estructural y biológico, para su utilización en la reparación de los tejidos duros del organismo.

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo general

Realizar la síntesis, caracterización y evaluación de las propiedades biológicas, de biocompósitos sinterizados de hidroxiapatita-wollastonita, preparados mediante dos técnicas sol-gel diferentes, y comparando su comportamiento con biomateriales sinterizados de wollastonita natural ( $\alpha$  y  $\beta$  wollastonita).

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Realizar la síntesis de hidroxiapatita mediante una primera técnica sol-gel, utilizando como agentes precursores, acetato de calcio  $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$  y trietil fosfato  $\text{PO}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ , y caracterizar estructuralmente el producto.
- Realizar la síntesis de hidroxiapatita mediante una segunda técnica sol-gel, utilizando como agentes precursores, nitrato de calcio  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y fosfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , y caracterizar estructuralmente el producto.
- Realizar la síntesis de una serie de biocompósitos de  $\beta$  wollastonita-hidroxiapatita, mediante los productos de hidroxiapatita obtenidos con las dos técnicas sol-gel, descritas anteriormente, con diferente porcentaje en peso de wollastonita natural de alta pureza ( $\beta$  wollastonita), y caracterizar estructuralmente los productos.
- Sinterizar los biocompósitos de  $\beta$  wollastonita-hidroxiapatita.
- Transformar mediante tratamientos térmicos la fase  $\beta$  wollastonita en  $\alpha$ -wollastonita y caracterizarla estructuralmente.
- Sinterizar cada una de las fases de wollastonita.
- Evaluar las propiedades biológicas de los biocompósitos sinterizados de hidroxiapatita y wollastonita *in vitro*: Bioactividad y Pruebas de Hemólisis.



## CAPÍTULO 2

### ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

#### 2.1. Generalidades

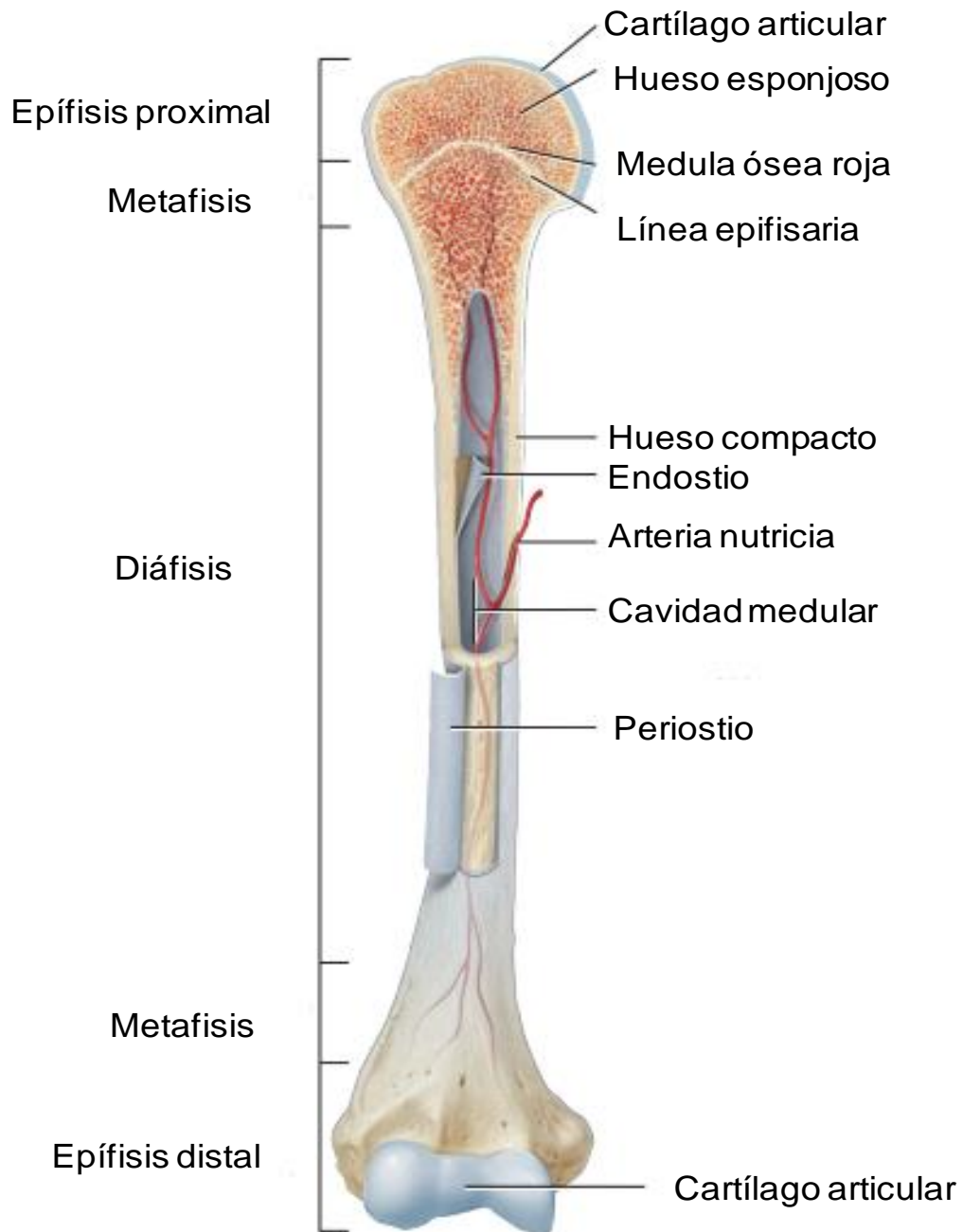
##### 2.1.1. Tejido óseo

Un hueso es el resultado de la organización y trabajo de varios tejidos: tejido óseo, cartílago, tejido conectivo denso, epitelio, tejido adiposo y tejido nervioso. Es por este motivo, que cada hueso se considera un órgano. El tejido óseo es un tejido vivo complejo y dinámico que experimenta una serie de cambios conocidos como remodelación (construcción de tejido óseo nuevo) y destrucción (eliminación del tejido óseo viejo) los cuales ocurren de manera simultánea y de forma continua [7].

El 18% del peso corporal lo constituye el tejido óseo, el cual desempeña las siguientes funciones principales:

- Sostén
- Protección
- Asistencia en el movimiento
- Homeostasis mineral
- Producción de células sanguíneas
- Almacenamiento de triglicéridos

La figura 1 muestra la estructura macroscópica del hueso considerando las partes de un hueso largo, como el húmero.



**Figura 1.** Estructura macroscópica de hueso (corte parcial de húmero) [7].

En cuanto a su estructura microscópica el tejido óseo contiene una abundante matriz extracelular que rodea a células muy separadas unas de otras. Esta matriz extracelular está formada de un 15% de agua, 30% de fibras de colágeno y 55% de sales minerales cristalizadas. La sal mineral más abundante es el fosfato de calcio  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  que, al combinarse con otra sal mineral como el hidróxido de calcio  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  forma cristales de hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Conforme se va llevando a cabo este proceso se combinan también con otras sales minerales como el carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) y con iones como el magnesio, flúor, potasio y sulfato. A medida que estas sales se depositan en las estructuras colágenas de la matriz extracelular, se cristalizan y el tejido se endurece, a este proceso se le conoce como calcificación. Las células que dan inicio a este proceso son células formadoras de hueso denominadas osteoblastos [7].

El tejido óseo presenta cuatro tipos celulares: células osteógenas, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (figura 2). A continuación, se desglosan cada una de ellas:

#### Células Osteógenas

Son células madre no especializadas que derivan del mesénquima, tejido del cual provienen todos los tejidos conectivos. Son las únicas células óseas que realizan división celular; las células resultantes se transforman en osteoblastos. Las células osteógenas se encuentran a lo largo del endostio, la región más interna del periostio y en los conductos intraóseos que contiene vasos sanguíneos [7].

#### Osteoblastos

Son células formadoras de hueso que sintetizan y secretan fibras colágenas y otros componentes orgánicos necesarios para construir la matriz osteoide, también inician la calcificación [7].

#### Osteocitos

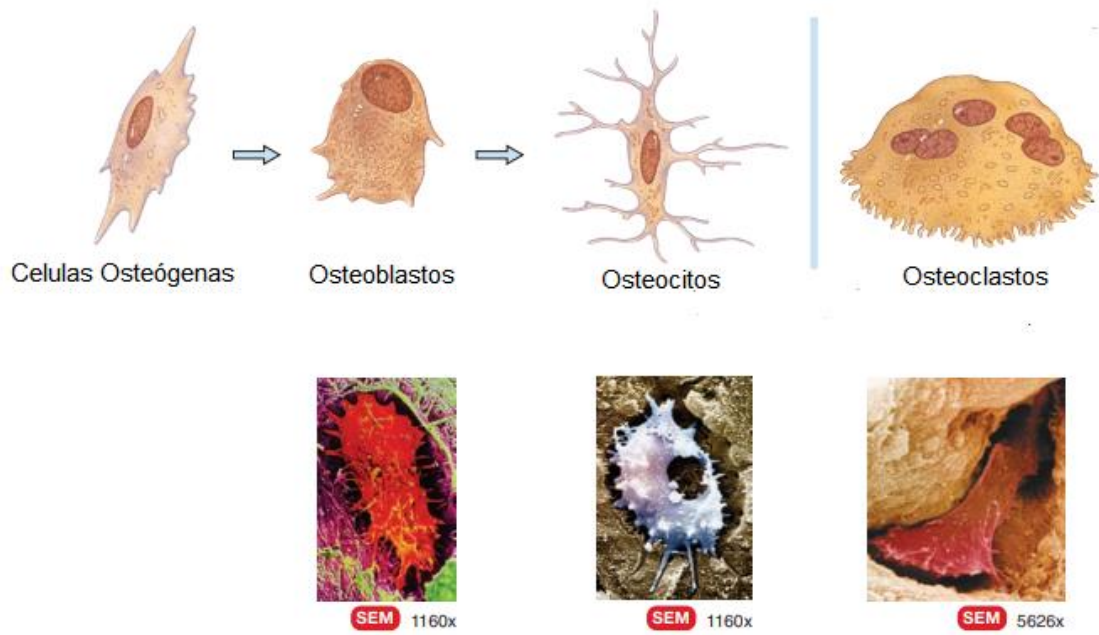
Son las células principales del hueso y mantienen su metabolismo diario a través del intercambio de nutrientes y productos metabólicos con la sangre [7].

### Osteoclastos

Son células grandes derivadas de la fusión de muchos monocitos (un tipo de glóbulo blanco). Esta célula libera poderosas enzimas lisosómicas y ácidos que digieren los componentes minerales y proteicos de la matriz celular subyacente. Esta descomposición de la matriz osteoide, denominada resorción, es parte del desarrollo normal del crecimiento, mantenimiento y reparación del hueso. El hueso no es completamente sólido debido a que tiene pequeños espacios entre sus células y los componentes de la matriz osteoide. Algunos espacios constituyen conductos para los vasos sanguíneos que suministran nutrientes a las células óseas. Según el tamaño y la distribución de los espacios, las regiones de un hueso pueden clasificarse como esponjosas o compactas [7].

### Tejido óseo compacto

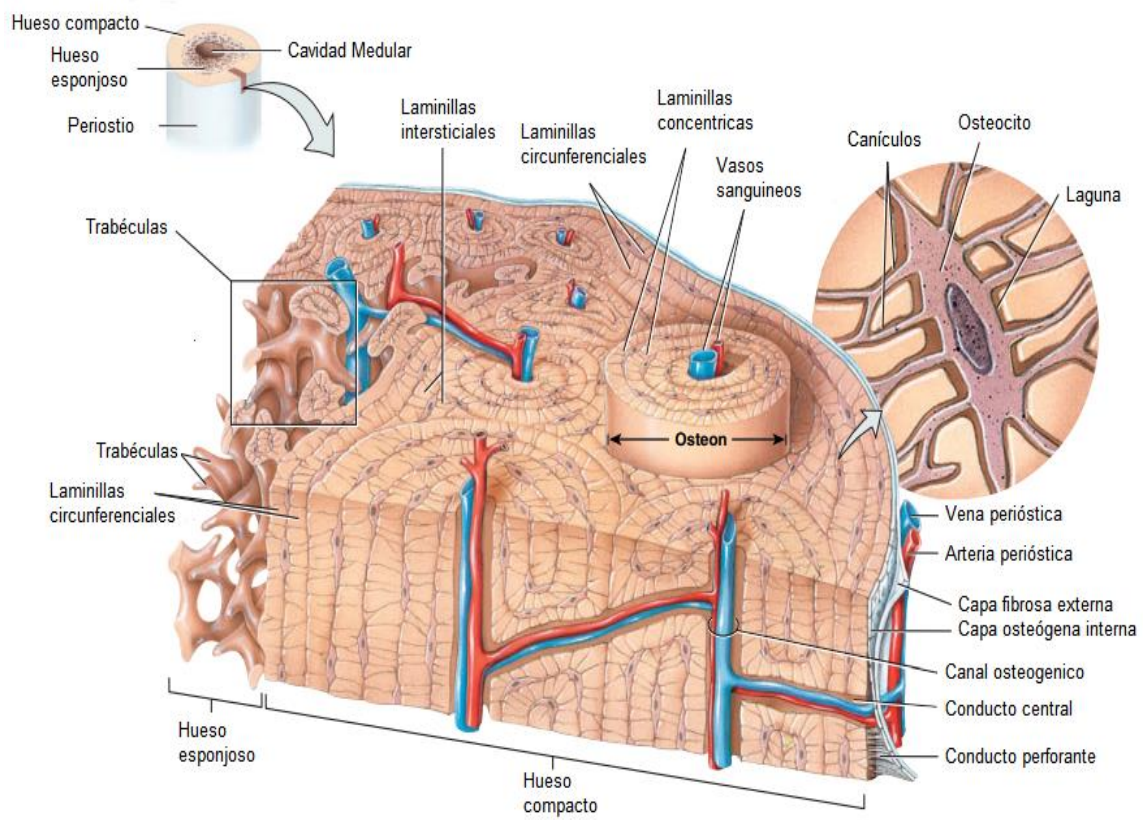
Contiene muy pocos espacios y es el componente más sólido del tejido óseo. Se encuentra por debajo del periostio de todos los huesos y forma la mayor parte de las diáfisis de los huesos largos. El tejido óseo compacto proporciona protección y soporte y ofrece resistencia a la tensión causada por el peso y el movimiento. A través del hueso compacto desde el periostio pasan los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos y los nervios, utilizando los llamados conductos perforantes transversos (conductos de Volkmann). Estos vasos y nervios se conectan con los de la cavidad medular, periostio y conductos centrales (harvesianos). Alrededor de estos conductos centrales hay laminillas concéntricas (anillos de matriz osteoide calcificada similares a las del tronco de un árbol). Los componentes del hueso compacto se organizan en unidades denominadas osteonas o sistemas harvesianos. Cada osteona consiste en un conducto central con sus laminillas concéntricas, lagunas, osteocitos y canalículos. Las osteonas se alinean en el tejido óseo compacto en la misma dirección a lo largo de líneas de tensión [7].



**Figura 2.** Tipos de células del tejido óseo [7].

### Tejido óseo esponjoso

El tejido óseo esponjoso no contiene osteonas, tiene láminas dispuestas en una red irregular de columnas delgadas que se denominan trabéculas. Los espacios macroscópicos entre las trabéculas hacen más livianos a los huesos y pueden a veces llenarse con medula ósea roja. Dentro de cada trabécula hay lagunas que contiene osteocitos. Debido a que los osteocitos se localizan en las superficies trabeculares, reciben sus nutrientes directamente desde la sangre circundante que atraviesan las cavidades medulares. La figura 3 muestra la histología del hueso compacto y del hueso esponjoso [7].



**Figura 3.** Histología del hueso compacto y del hueso esponjoso [7].

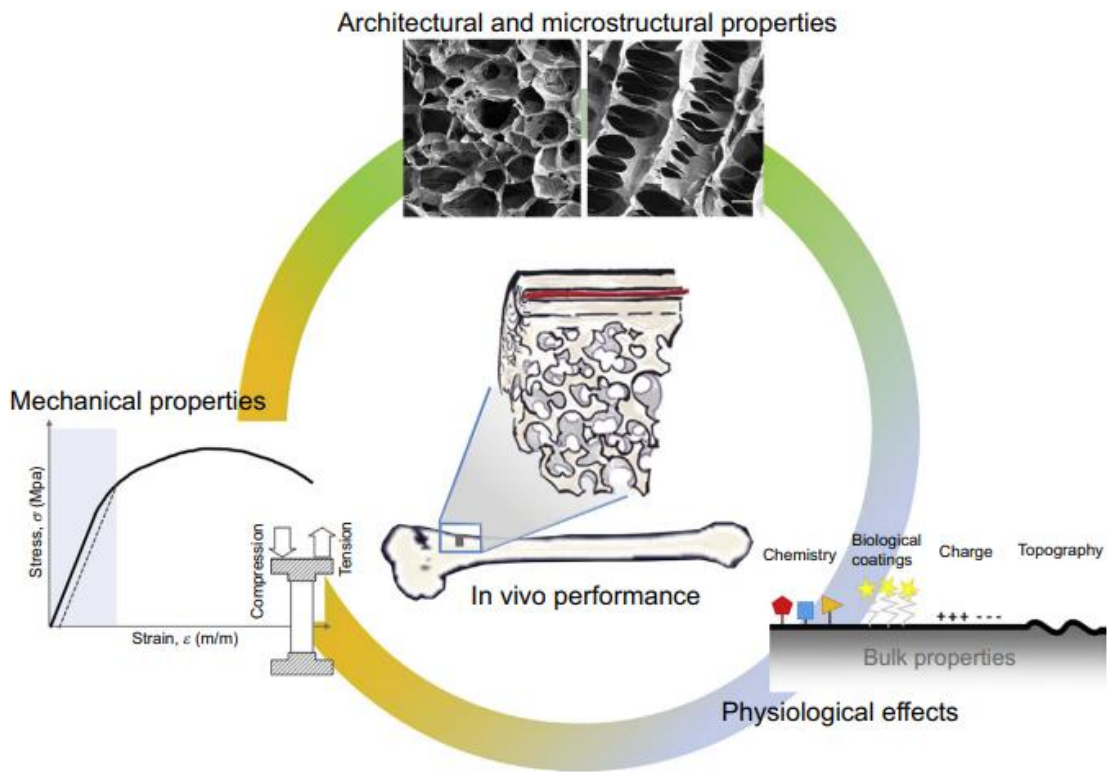
## 2.2. Biomateriales

Los biomateriales son aquellos materiales sintéticos o naturales utilizados para reemplazar partes de sistemas vivos o para funcionar con el tejido vivo. Los biomateriales están diseñados para evaluar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. Un biomaterial es diferente de un material biológico como el hueso que es producido por el sistema biológico. Caderas artificiales, stents vasculares o catéteres son todos hechos de diferentes biomateriales y comprenden diferentes dispositivos médicos [8].

El éxito en los materiales implantados en el tejido vivo va depender del buen control de las propiedades del material y de encontrar la aplicación adecuada para cada individuo. Los biomateriales se han utilizado en varias aplicaciones óseas desde materiales ortopédicos hasta dentales, pero en todos los casos la caracterización es clave para garantizar que la función a la cual fue diseñado el biomaterial funcione de manera correcta. Un factor a tomar en cuenta es la influencia del biomaterial en cuanto a sus propiedades microestructurales y cuál es su efecto en el desempeño del mismo en situaciones de carga o esfuerzo, además de cómo altera el medio ambiente que rodea al implante. Comprender las debilidades y fortalezas del biomaterial ayuda a entender si el material es susceptible a la degradación in vivo, o en el caso de volverse más fuerte y resistente poder utilizar esa condición para mejorar las posibilidades de éxito en la aplicación del material implantado [9].

La figura 4 muestra como las propiedades mecánicas, estructurales y fisiológicas de los materiales interactúan unas con otras haciendo necesario su estudio para poder controlar el desarrollo del biomaterial.





**Figura 4.** Interrelación de las propiedades de los biomateriales [9].

### 2.3. Biocerámicos

Los materiales cerámicos son un recurso importante de los biomateriales para aplicaciones en ingeniería biomédica. Los cerámicos destinados a estar en contacto con tejidos vivos se denominan biocerámicos. A través de los años los biocerámicos han experimentado desarrollos importantes sobre todo en los últimos 30 años, esto debido a las necesidades médicas de una población mundial cada vez mayor y a un incremento en la esperanza de vida. Este impulso a generado una gran cantidad de trabajos de investigación en busca de nuevos materiales para la fabricación de implantes. Estos materiales están siendo utilizados en aplicaciones clínicas específicas, sobre todo en ortopedia y odontología para reparar tejidos vivos dañados por enfermedades o traumas. El uso de biocerámicos representa una evolución en el desarrollo de la ciencia mundial. Entre ellos se encuentra la alúmina, zirconio, fosfatos de calcio, silicatos de calcio, ciertos vidrios y vidrios-cerámicos, entre otros [10].

Existen varios factores afectan la reactividad de las sustancias químicas y determinan de manera importante su cinética de reacción. Tomando en cuenta la naturaleza bioactiva o inerte de diferentes cerámicos para aplicaciones médicas, así como factores cinéticos como tamaño de partícula y porosidad, se distinguen tres grupos de biocerámicos: inertes, bioactivos y biodegradables.

#### Biocerámicos inertes

Son aquellos materiales que conservan su estructura una vez que han sido implantados y no generan alguna respuesta inmunológica en el huésped.

#### Biocerámicos bioactivos

Estos materiales interactúan con el huésped formando enlaces con los tejidos vivos.

#### Biocerámicos biodegradables

Son materiales que se degradan en el huésped mientras ocurre una regeneración de tejido, los subproductos químicos de estos materiales son absorbidos y liberados a través de los procesos metabólicos del cuerpo.

El objetivo final de la síntesis de biocerámicos para reemplazo de tejido óseo consiste en implantar un material cerámico capaz de regenerar el hueso dañado. Esto es posible si el biocerámico es bioactivo. Por otra parte, si el biocerámico es inerte, el hueso será reemplazado por un material que el organismo puede tolerar, pero que no puede sustituir por regeneración ósea.

En el caso de algunos vidrios-cerámicos que presentan los más altos niveles de bioactividad, se encontró que eran capaces de formar enlaces tanto con tejidos blandos como con tejidos duros, mientras que otros materiales bioactivos solo forman enlaces con los tejidos duros. Para explicar estas diferencias en la reactividad se definieron 2 clases de bioactividad: Clase A osteoinductivo y osteoconductor, clase B únicamente osteoconductor. Un biocerámico con bioactividad clase A es aquel material que provoca respuesta extracelular e intracelular, mientras que el biocerámico con bioactividad clase B solo obtiene una respuesta extracelular. La osteoinducción ocurre cuando el hueso prolifera sobre la superficie particulada de una masa debido a la mejora en la actividad del osteoblasto. Tanto la mitosis mejorada como la diferenciación de células madre de osteoblastos estimuladas por la lenta reabsorción de las partículas bioactivas clase A parecen ser las responsables de la osteoinducción. La osteoconductividad se define como la unión y el característico crecimiento óseo a lo largo de una superficie [11,12].

## 2.4. Hidroxiapatita

Desde mediados de la década de 1970, varios grupos de investigación han realizado avances en el desarrollado de biocerámicos que incluyen el empleo de la hidroxiapatita como un biomaterial para el aumento, reparación y sustitución ósea [13-15]. Esto bajo la justificación de que el mineral que compone los huesos se ha descrito como hidroxiapatita, cuya fórmula corresponde a  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  con una relación molar  $\text{Ca}/\text{P} = 1.67$ . Presenta una estructura cristalina perteneciente al sistema hexagonal con un grupo espacial  $\text{P6}_3/\text{m}$ . Este grupo espacial se caracteriza por la existencia de seis ejes-c perpendiculares a tres ejes-a equivalentes ( $a_1, a_2, a_3$ ) con ángulos de  $120^\circ$  uno del otro. La celda unitaria presenta las siguientes dimensiones:  $a = b = 9.432 \text{ \AA}$ ,  $c = 6.881 \text{ \AA}$  consistiendo de grupos  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{OH}^-$  muy juntos como se muestra en la figura 5 [16].

Los diez átomos de calcio pertenecen a  $\text{Ca}(\text{I})$  o  $\text{Ca}(\text{II})$  dependiendo de su entorno. Cuatro átomos de calcio ocupan las posiciones  $\text{Ca}(\text{I})$ : dos en niveles  $z = 0$  y dos a  $z = 0.5$ . Seis átomos de calcio ocupan las posiciones de  $\text{Ca}(\text{II})$ : un grupo de tres átomos de calcio que describen un triángulo ubicado en  $z = 0.25$ , el otro grupo de tres en  $z = 0.75$ , que rodea los grupos  $\text{OH}^-$  ubicados en las esquinas de la celda unitaria en  $z = 0.25$  y  $z = 0.75$ , respectivamente. Los seis fosfatos ( $\text{PO}_4$ )<sup>3-</sup> tetraédricos están en una disposición helicoidal desde  $z = 0.25$  hasta  $z = 0.75$ . La red de grupos  $\text{PO}_4$ <sup>3-</sup> proporciona el marco esquelético el cual brinda estabilidad a la estructura de la hidroxiapatita [17].

La estructura de la hidroxiapatita permite la sustitución de muchos iones sin cambiar significativamente su simetría hexagonal. En algunos casos el estroncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ), Bario ( $\text{Ba}^{2+}$ ), Plomo ( $\text{Pb}^{2+}$ ) pueden sustituir al calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), sulfatos, vanadatos pueden sustituir al fosfato ( $\text{PO}_4$ )<sup>3-</sup>; y el fluoruro ( $\text{F}^-$ ), cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) o Bromuro ( $\text{Br}^-$ ) pueden sustituir a los  $\text{OH}^-$  [18-20]. Sin embargo, los carbonatos ( $\text{CO}_3$ )<sup>2-</sup> presentan la mayor sustitución en la parte mineral del hueso con una proporción que va de 2.3-8% en porcentaje en peso, variando con la edad del individuo [21,22]. Los carbonatos cuando sustituyen a los grupos hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) se designan como Tipo A y cuando sustituyen a los grupos fosfato ( $\text{PO}_4$ )<sup>3-</sup> se designan como Tipo B como se muestra en la figura 6.

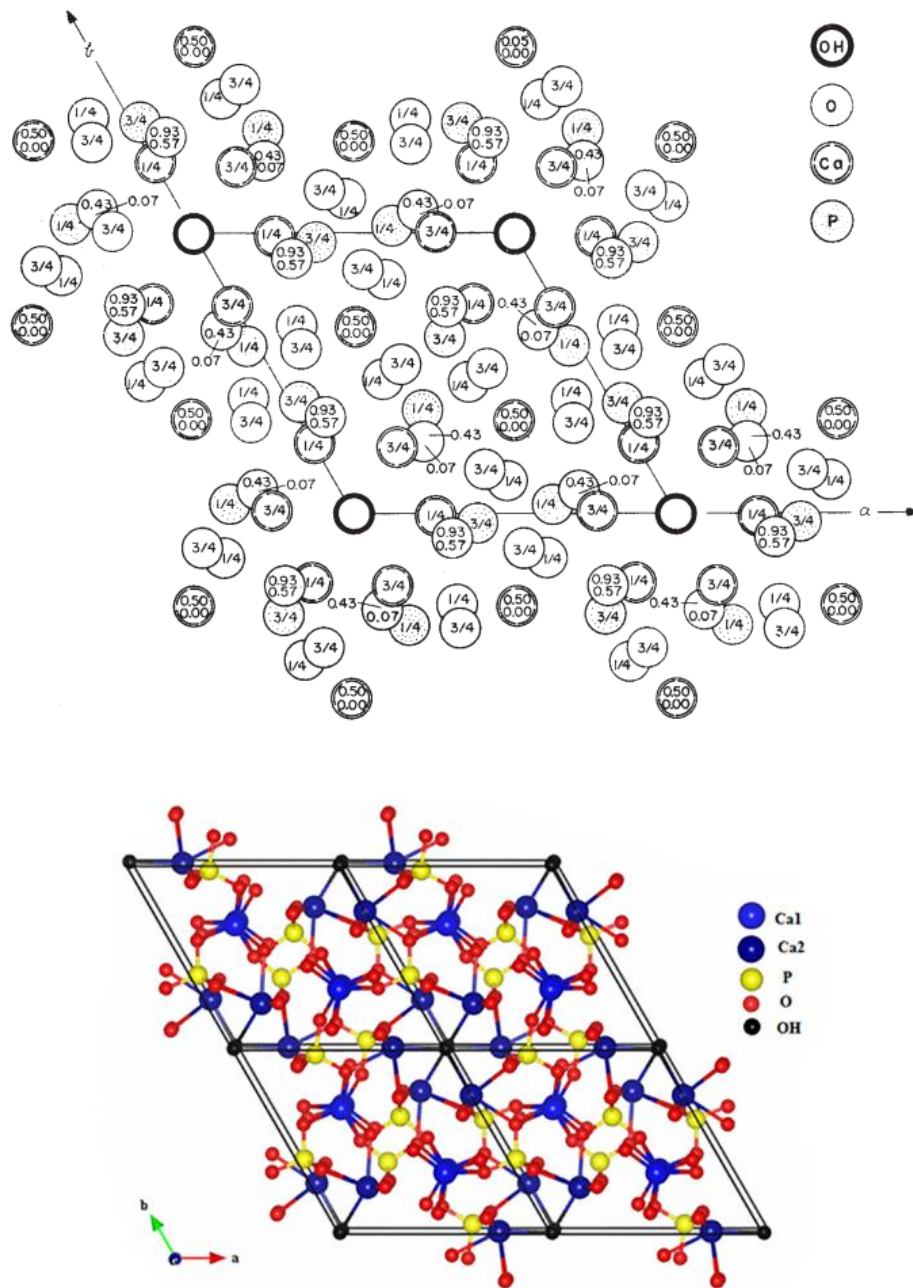


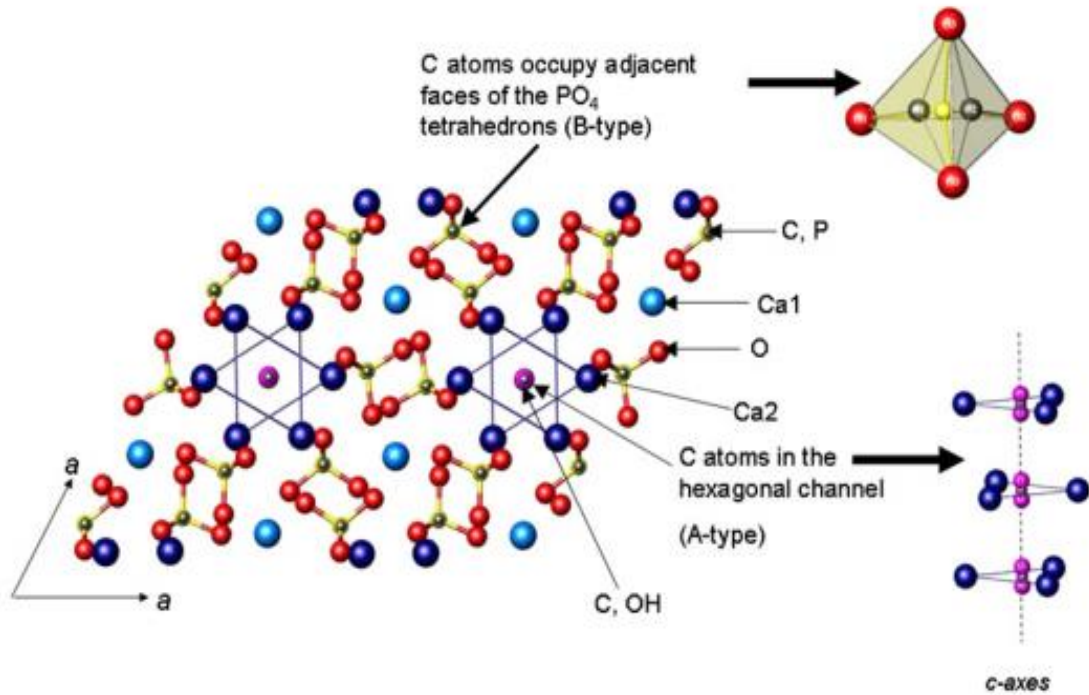
Figura 5. Arreglo atómico de la hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  en una celda unitaria hexagonal [16,25].

Siendo esta última sustitución, la más parecida a la estructura de la fase mineral de los huesos, las cuales se denominan apatitas biológicas. En muchos casos, las apatitas biológicas son deficientes en calcio ( $Ca/P = 1.5-1.65$ ) presentando la sustitución de los grupos fosfato por grupos carbonato, este es el motivo por el cual se refieren a ellas también como hidroxapatita carbonatada del Tipo B [23,24].

Aunque la cantidad de carbonatos es muy baja, juegan un papel esencial en las reacciones biológicas asociadas con el metabolismo óseo. Así mismo, la presencia de carbonatos en la estructura de la hidroxapatita muestra una gran influencia en su naturaleza; aumenta su solubilidad en ambientes ácidos, disminuye la cristalinidad y retarda el crecimiento de cristales, mostrando excelentes resultados en los tratamientos de reparación de defectos óseos.

## 2.5. Wollastonita

La wollastonita es un silicato de calcio con fórmula molecular  $CaSiO_3$ , tiene una composición de 51.75% en peso de dióxido de silicio ( $SiO_2$ ) y 48.25% en peso de óxido de calcio ( $CaO$ ) [27]. Presenta dos fases cristalográficas, la fase  $\beta$ -wollastonita que consiste en una estructura triclinica y la  $\alpha$ -wollastonita la cual presenta una estructura cristalina monoclinica, estas son las formas de baja y alta temperatura de la wollastonita respectivamente [28-32]. Existen dos formas estrechamente relacionadas del polimorfismo a baja temperatura, las cuales son: wollastonita (wollastonita-1T) que posee una estructura cristalográfica triclinica y la que posee una estructura cristalográfica monoclinica conocida como parawollastonita o wollastonita 2-M. Existen otros polimorfismos raros de este mineral como la wollastonita-3T, wollastonita-4T, wollastonita-5T y wollastonita-7T. En general, cuando se habla de wollastonita, se refiere a la forma triclinica de la wollastonita o wollastonita-1T. La estructura cristalina de la wollastonita consiste en cadenas de oxígeno-silice ( $SiO_4$ ) tetraédricas unidas para formar infinitas cadenas triples unidimensionales de  $[Si_3O_9]^{6-}$  (Figura 7a).



**Figura 6.** Estructura cristalina de la hidroxiapatita, que muestra las posibles posiciones de los iones carbonato [26].

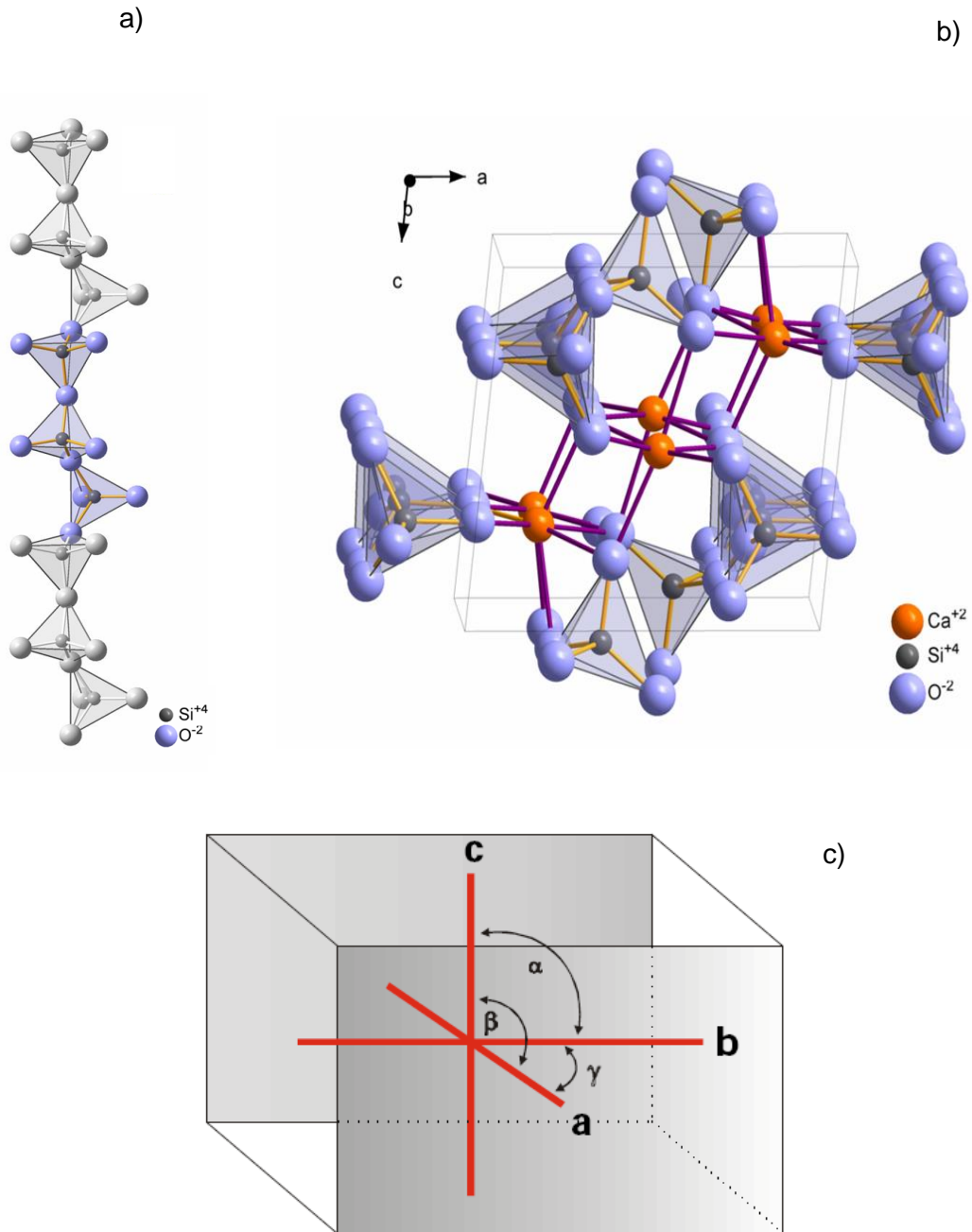
Estas, están enlazadas entre sí por iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) coordinadamente con los átomos de oxígeno, lo cual compensa la carga eléctrica, ubicándose paralelamente al eje cristalográfico  $b$  (Figura 7b). Esto explica el por qué los cristales siempre se extienden en la dirección de  $b$  [010]. (El crecimiento en la dirección  $b$  corresponde longitudinalmente a la estructura que se presenta en la Figura 7c) [33].

La wollastonita tiene una estructura cristalina perteneciente al grupo triclinico, con un grupo espacial P1, con parámetros y ángulos de red:  $a = 7.94 \text{ \AA}$ ,  $b = 7.32 \text{ \AA}$ ,  $c = 7.07 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90^\circ 2'$ ,  $\beta = 95^\circ 22'$ ,  $\gamma = 103^\circ 26'$ .

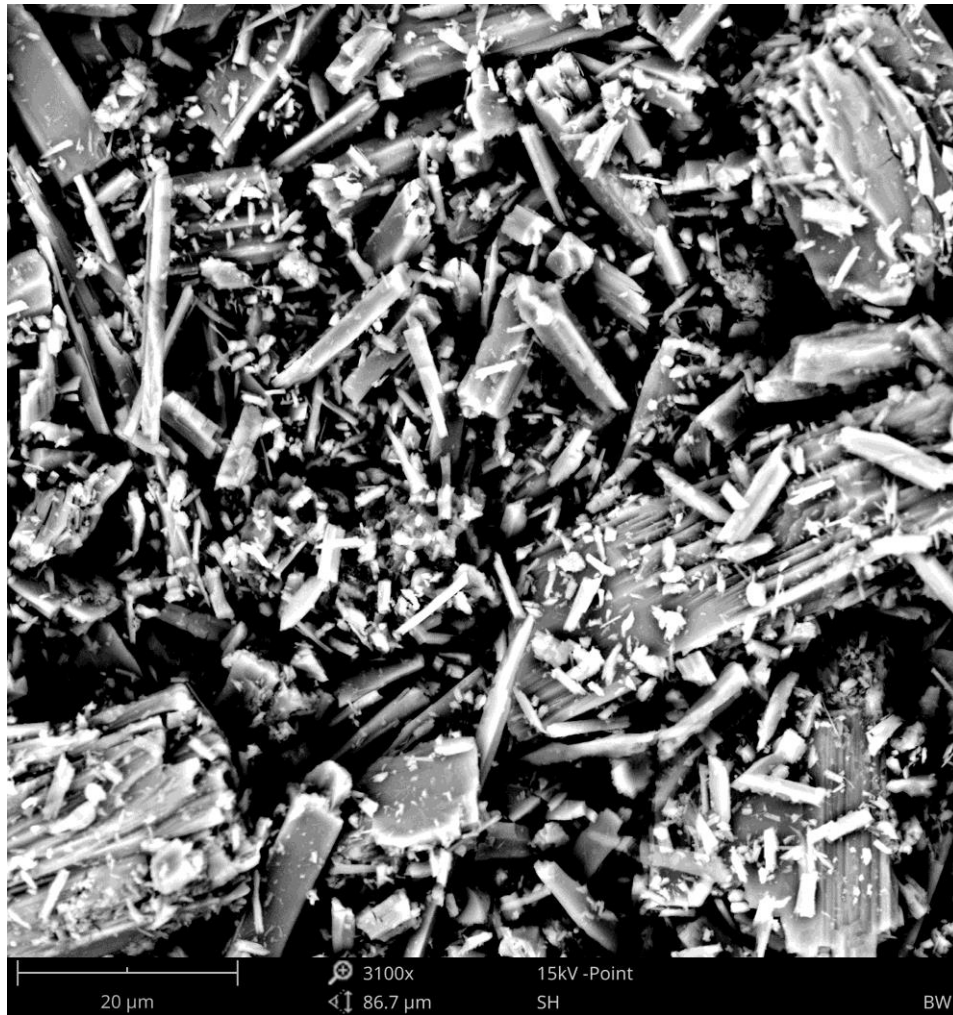
La wollastonita posee algunas propiedades únicas, tales como alta blancura, baja absorción de humedad, baja expansión térmica, entre otras; lo cual hacen que este material sea muy utilizado en diferentes industrias como la cerámica, química, metalurgia, polímeros y construcción [34]. En las últimas dos décadas ha sido empleado en el campo de la ortopedia como implante óseo en reparación de tejido dañado por sus excelentes propiedades bioactivas, biocompatibilidad y no toxicidad. Presenta la capacidad de formación de capas de apatita sobre su superficie al ser sumergido en fluido fisiológico simulado (SBF), saliva artificial y en ambientes vivos. Estas capas de apatita juegan un papel importante para lograr una estrecha unión entre los tejidos óseos y los implantes [35-39]. La wollastonita presenta una morfología acicular como se observa en la figura 8, la cual les proporciona una mayor eficiencia mecánica a los materiales compósitos donde se aplica como material de refuerzo [40].

México es uno de los principales productores de wollastonita a nivel mundial siendo el yacimiento del estado de Sonora (Hermosillo, Minera Roca Rodando S. de R.L. de C.V.) el más importante en cuanto a pureza del mineral y escala de producción, los de Zacatecas (Pánfilo Natera) e Hidalgo (Villa Juárez) de pequeña y mediana producción respectivamente [41].





**Figura 7.** Estructura de la wollastonita,  $\text{CaSiO}_3$ : a) Cadena de  $\text{SiO}_4$ , b) Estructura cristalina, c) Ejes cristalográficos de una estructura triclinica [33].



**Figura 8.** Micrografía de microscopio electrónico de barrido de la wollastonita,  $\text{CaSiO}_3$  mostrando su forma acicular característica.

## 2.6. Técnica Sol-Gel

El proceso sol-gel es un método físico-químico de gran relevancia para la producción de nuevos materiales, desde polímeros orgánicos hasta coloides y óxidos. Este procedimiento tiene ciertas ventajas económicas tales como bajo consumo de energía, bajo costo de operación y un impacto ambiental muy reducido. Por otra parte, la técnica sol-gel ofrece otras ventajas para la producción de biomateriales con respecto a los procesos tradicionales, entre las que se encuentran: una mayor homogeneidad en el mezclado de los reactivos a nivel molecular, baja temperatura de proceso lo que hace posible tener un control más riguroso de los parámetros de la técnica, altos niveles de pureza, un mejor control de distribución de tamaño de polvos, entre otros [42,43]. El procedimiento consiste de 4 etapas principales, las cuales se describen a continuación:

1.- Preparación del sol. Para poder obtener el sol se necesitan al menos 2 componentes, uno debe ser un fluido donde los otros componentes (uno o más) se encuentran en suspensión formando un coloide (sistema coloidal fluido) que es un sistema formado por 2 o más fases, normalmente una fluida y otra dispersa en forma de partículas sólidas muy finas, entre los diámetros de nanómetros y micrómetros. Es importante mantener el tamaño de partícula en estos rangos ya que con esto el equilibrio del sistema estará gobernado por el movimiento browniano, asegurando que el sol se mantenga estable; por el contrario, si se tienen tamaños de partícula mayores, la fuerza de gravedad se vuelve predominante empujando a las partículas a formar sedimentos. No se necesita tener una simetría en particular; ninguna limitación existe en cuanto a la estructura de la partícula, por lo que pueden ser amorfos, cristalinos, porosos o densos. Óxidos, hidróxidos y sales tanto orgánicas como inorgánicas (cloruro, nitrato, sulfato) se utilizan como precursores en sistemas acuosos. Los metal-alcóxidos son parte de la gran familia de compuestos metal-orgánicos y son los precursores más ampliamente utilizados, debido a que reaccionan fácilmente con el agua y están disponibles para muchos metales. Durante esta etapa se desarrollan reacciones de “hidrólisis” de los alcóxidos metálicos con el agua, formándose hidróxidos metálicos. Asimismo, los hidróxidos metálicos se combinan para producir un

óxido metálico liberando además una molécula de agua o de alcohol, motivo por el cual, esta segunda reacción recibe el nombre de “condensación” [44].

2.- Transición sol a gel (gelificación) Esta transformación se debe a las reacciones de hidrólisis, condensación y a la conversión progresiva de los sitios reactivos en puentes de enlace que van formando un agregado gigante denominado gel. En el momento de la formación del gel hay muchos agregados en el sol que se unen entre sí para formar una red sólida, responsable de la elasticidad, ocurriendo un cambio abrupto en la viscosidad [45].

3.- Envejecimiento. Después de la gelificación, el gel se envejece, ya sea a temperatura ambiente o elevando la temperatura durante varias horas. Es importante destacar que el proceso de envejecimiento fortalece al gel a medida que el sistema continúa reaccionando, dando lugar a reacciones de “polimerización” donde aumenta la densidad y la resistencia mecánica del sólido. Ocurren también otras reacciones tales como sinéresis, maduración y cambios de fase. Este proceso es muy importante, ya que sin la etapa de envejecimiento el gel se agrietará durante el secado.

4.- Secado y Tratamiento térmico. El objetivo de la etapa de secado es eliminar los subproductos de la reacción de condensación. A medida que el agua y el alcohol se evaporan, causan una contracción acompañada de endurecimiento del gel, asimismo dejan una red de poros interconectados con diámetros en el rango de los nanómetros. Al material seco producido en esta etapa se le define con el nombre de “xerogel”. Durante el tratamiento térmico ocurren una serie de cambios físicos y químicos en los materiales, los cuales pueden llevar a la transformación de fases existentes y la aparición de nuevos compuestos. Estos cambios pueden ser analizados mediante las técnicas como el análisis termogravimétrico y dilatometría entre otras [46-48].

## 2.7. Fluido Fisiológico Simulado (SBF)

En 1980 Larry Hench, demostró que una capa rica en  $\text{SiO}_2$  y fosfato de calcio se forma sobre la superficie de un biovidrio (Bioglass) cuando es implantado en un ambiente fisiológico, lo cual permite un enlace con el hueso huésped, y que esta formación *in vitro* de fosfato de calcio puede ser reproducida en una solución búfer que consiste de Tris hidroximetilaminometano y ácido clorhídrico (Tris solución-búfer) a un pH de 7.4 [49].

Kokubo et al. (2006), usando micro difracción de rayos-X identificaron esta capa de fosfato de calcio como apatita cristalina [50]. En trabajos posteriores demostraron que la formación de apatita sobre un vidrio-cerámico puede ser reproducida en un fluido fisiológico sin células y con la concentración iónica igual a la del plasma sanguíneo humano, pero sin la Tris solución-búfer [51,52]. Las técnicas de caracterización (XRD, TEM, SEM, FT-IR) aplicadas a la superficie de apatita formada en el fluido fisiológico simulado (SBF) mostraron que es similar al tejido óseo en su estructura y composición. A partir de estos trabajos de investigación se propuso que la bioactividad *in vivo* de un material puede predecirse mediante la capacidad para formar una capa de apatita sobre su superficie, al ponerse en contacto con el fluido fisiológico simulado (SBF) [53].

Cabe destacar que la formulación original de la solución SBF utilizada por Tadashi Kokubo y Larry Hench, no consideraba a los iones  $\text{SO}_4^{2+}$  contenidos en el plasma humano. Sin embargo, esta solución fue corregida por el mismo Kokubo, conocida como “corrected SBF (c-SBF)” como se muestra en la tabla 1, la cual se reporta convencionalmente como solución SBF en la mayoría de las investigaciones relacionadas con esta técnica. Esta solución corregida comparada con el plasma sanguíneo humano aun es rica en ion  $\text{Cl}^-$  y deficiente en ion  $\text{HCO}_3^-$ . Oyane et al. (2003), trataron de corregir estas diferencias formulando una solución conocida como “revised SBF (r-SBF)”, en la cual las concentraciones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$  fueron disminuidas e incrementadas respectivamente, hasta alcanzar los niveles del plasma sanguíneo humano. Sin embargo; como el carbonato de calcio tiene fuerte tendencia a precipitar, no solo se produjeron precipitados de apatita sino también de calcita [54].

Takadama et al. (2004), propusieron una nueva modificación en la solución SBF, conocida como “newly improved SBF (n-SBF)” en la cual solo disminuyeron la concentración del ion  $\text{Cl}^-$  hasta el nivel del plasma sanguíneo, dejando la concentración del ion  $\text{HCO}_3^-$  igual al de la c-SBF. Esta nueva formulación fue comparada con la formulación corregida por Kokubo (c-SBF), con respecto a su estabilidad y reproducibilidad para producir apatita sobre materiales sintéticos, con lo cual se constató que el comportamiento de c-SBF no difiere del n-SBF en estos 2 aspectos [55].

En 2003 se presentó ante el Comité Técnico ISOTC/150 de la Organización Internacional para la Estandarización, la metodología para la preparación de esta formulación convencional para la solución c-SBF, como una solución indicada para la medida “in vitro” de la habilidad de los materiales de implante para formar una capa de apatita sobre su superficie, como una predicción de la bioactividad de estos materiales al momento de ser implantados dentro del organismo [3].

**Tabla 1.** Concentración iónica del fluido fisiológico simulado (SBF) propuesto por Kokubo et al. (2006), comparada con el plasma sanguíneo humano.

Concentración de los iones (mM)								
	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Cl}^-$	$\text{HCO}_3^-$	$\text{HPO}_4^{2-}$	$\text{SO}_4^{2-}$
<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

pH ajustado a 7.4 por adición de Tris-(Hidroximetil)-aminometano  $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$  y HCl 1M a 37°C.

## 2.8. Análisis de la Bioactividad

La evaluación de la bioactividad es uno de los análisis realizados a los biocerámicos orientados a ser utilizados como materiales de implante. Consiste en poner a estos materiales en contacto con fluidos fisiológicos simulados, reproduciendo las condiciones del cuerpo humano, con el fin de determinar su respuesta dentro del huésped y definir la posibilidad de su aplicación como materiales de implante con carácter bioactivo. En general, un material bioactivo representa un material que está diseñado para inducir una actividad biológica específica. Más específicamente un material bioactivo representa un material que sigue un proceso de dos pasos tras su implantación dentro del cuerpo. El primer paso, el material sufre reacciones en su superficie con el fluido fisiológico simulado (SBF), durante el segundo paso forma una capa de hidroxiapatita carbonatada, un material biológicamente activo, el cual es química y estructuralmente equivalente a la fase mineral del hueso (responsable de las interacciones entre los tejidos duros y tejidos blandos), logrando eventualmente igualar el comportamiento mecánico del implante con el tejido a reemplazar. Los biocerámicos que presentan este tipo de comportamiento se les denomina bioactivos [51,56,57].

Inmersión de los materiales en la solución SBF. Una vez formulada la solución SBF, se procede a calcular el volumen apropiado de la misma, de acuerdo a las dimensiones del espécimen a evaluar.

Para materiales densos, se miden las dimensiones del espécimen y se calcula su área superficial. Seguidamente se calcula el volumen de solución SBF que será usado para el análisis de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$V_s = \frac{S_a}{10} \quad (1)$$

donde  $V_s$  es el volumen de la solución SBF en mL y  $S_a$  es el área del espécimen en  $\text{mm}^2$ .

Para materiales porosos, el volumen de solución SBF utilizado para el análisis, debe ser mayor al calculado con la ecuación (1).

A continuación, se describe el procedimiento a seguir:

1.- Una vez calculado el volumen adecuado de la solución SBF, este se coloca en un recipiente de plástico. Después de calentar la solución a 37°C, el espécimen se sumerge completamente en ella.

2.- Después de sumergir el espécimen en la solución SBF y mantenerlo a 37°C, el análisis de bioactividad se puede realizar en diferentes intervalos de tiempo dentro de las primeras cuatro semanas. Lo anterior se debe a que los materiales bioactivos, generalmente producen una capa de hidroxiapatita carbonatada sobre sus superficies, dentro de las primeras cuatro semanas de inmersión [3].

3.- Una vez transcurrido el tiempo de análisis, el espécimen se saca de la solución SBF y se lava con agua deionizada. Seguidamente se seca a temperatura ambiente.

4.- Finalmente se analiza la nueva capa formada sobre la superficie de los materiales, así como también, la carga iónica y el pH de la solución SBF remanente [58].

## **2.9. Evaluación de las Propiedades Hemolíticas**

La hemolisis se refiere a la ruptura de los glóbulos rojos. Esto provoca la liberación de la hemoglobina, generando menos células que transporten oxígeno a las diferentes partes del cuerpo humano [59]. El análisis de este efecto es importante para los nuevos materiales que se utilizaran en aplicaciones biomédicas. En la mayoría de los estudios *In Vitro*, las determinaciones de las propiedades hemolíticas se basan en la evaluación del porcentaje de hemolisis mediante el análisis por espectrofotometría del plasma libre de hemoglobina, derivado de la interacción del material con los componentes de la sangre (glóbulos rojos) mediante incubación y procesos de centrifugación [60,61]. La hemolisis es consecuencia de varios factores, tanto físicos como químicos, algunos autores sugieren prestar especial atención en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) [62-64], el efecto del grupo silanol en la superficie del glóbulo rojo [65,66], el grado de hidrofiliidad e hidrofobicidad del material [67], las condiciones del



medio en términos de pH [68,69], la cristalinidad [70,71], y especialmente el tamaño de partícula, circularidad y morfología del biomaterial a evaluar [72-74].

## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Síntesis de Hidroxiapatita Ruta I

Para producir hidroxiapatita carbonatada tipo-B, se utilizaron como agentes precursores acetato de calcio  $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$  (Sigma-Aldrich, Tokio, Japón) y trietil fosfato  $\text{PO}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Con el fin de obtener 1.0 g de polvo de hidroxiapatita, se disolvieron en 10 mL de agua deionizada 0.02 moles de acetato de calcio en agitación ultrasónica (40 kHz de frecuencia), seguidamente se agregaron gota a gota 0.012 moles de trietil fosfato para obtener una relación molar Ca/P igual a 1.67. La mezcla de precursores se agito por 12 h a una temperatura entre 25-30°C en agitación magnética. Seguidamente se elevó la temperatura entre 40-45°C manteniendo la agitación durante 12 h. Una vez concluida la agitación se elevó la temperatura a 75°C manteniéndose durante 10 h, una vez que se observa la gelación en el sistema estos geles fueron secados a 120°C por 10 h. Los geles secos fueron molidos en un mortero de ágata obteniéndose un polvo fino, posteriormente son tratados térmicamente hasta 1000°C, en un horno de alta temperatura Thermolyne 46100 (Thermolyne, Bubuque, IA) en aire. La temperatura se elevó utilizando una rampa de calentamiento programada a razón de 10°C/min hasta llegar a la temperatura de 1000°C, manteniéndose durante 5 h. Posteriormente, los materiales se sacaron del horno permitiendo un enfriamiento al medio ambiente. Después del tratamiento térmico y con el objetivo de purificar y obtener únicamente la fase de hidroxiapatita, los materiales se dispersaron y agitaron durante 2 h en 150 mL de una solución de HCl 0.01M. Las fases sólido y líquida se separaron mediante filtración a través de papel Wathman No. 42. El material sólido fue lavado varias veces con agua deionizada y secado a 120°C por 2 h. El compósito  $\beta$ -wollastonita 50-50 hidroxiapatita carbonatada

tipo B ( $\beta$ -W50-50HC) se sintetizó siguiendo la ruta I añadiendo la cantidad adecuada de  $\beta$ -wollastonita para obtener 50% en peso (1.0 g) de cada material [5].

### 3.2. Síntesis de Hidroxiapatita Ruta II

Para producir hidroxiapatita estequiométrica (codificada como H350 y H750) se utilizaron como agentes precursores nitrato de calcio  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich USA) y fosfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (Sigma, Japón). Las cantidades de los reactivos se eligieron en orden de mantener una relación molar Ca/P de 1.67 de hidroxiapatita estequiométrica. Para obtener 1.0 g de polvo de hidroxiapatita pura, 0.1639 moles de nitrato de calcio fueron disueltos en 10 mL de agua deionizada en agitación ultrasónica (40 kHz de frecuencia) durante 15 min, seguidamente se agregaron 0.0979 moles de fosfato de amonio continuando con la agitación ultrasónica durante 30 min. Posteriormente la mezcla de precursores se agitó a temperatura ambiente en agitación magnética, el pH de la mezcla fue controlado entre 6 y 7 con amonio líquido por aproximadamente 2 h, hasta observar la gelación en el sistema. El gel fue secado a 120°C por 12 h. Seguidamente el gel seco fue molido en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino, posteriormente estos polvos se sometieron a un tratamiento térmico a dos diferentes temperaturas 350°C (obteniéndose un material codificado como H350) y 750°C (obteniéndose un material codificado como H750) en aire durante 3 h. La temperatura se elevó utilizando una rampa de calentamiento programada de 10°C/min, posteriormente los materiales fueron sacados del horno permitiendo un enfriamiento al medio ambiente [43].

### 3.3. Wollastonita

Se utilizó wollastonita natural de alta pureza ( $\text{CaSiO}_3$ , NYAD, Minera Roca Rodando S. de R.L. de C.V. procedente del depósito "Pilares", Hermosillo, Sonora, México), con un 98.25% de pureza. En las tablas 2 y 3 se presenta el análisis químico y las propiedades típicas de la wollastonita utilizada para este estudio.

**Tabla 2.** Composición química de wollastonita NYAD® M200, producida por la Minera Roca Rodando S. de R.L. de C.V. [75]

<b>Composición Química</b>	<b>CaSiO<sub>3</sub></b>
<b>Componentes</b>	<b>Valores Típicos %</b>
CaO	46.25
SiO <sub>2</sub>	52.0
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.25
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.40
MnO	0.025
MgO	0.50
TiO <sub>2</sub>	0.025
K <sub>2</sub> O	0.15
% de pérdida de peso (1000°C)	0.40

**Tabla 3.** Propiedades típicas de wollastonita NYAD® M200, producida por Minera Roca Rodando S. de R.L. de C.V. [75]

<b>Propiedades Típicas</b>	<b>Valor</b>
Apariencia	Blanca
Morfología	Acicular
Peso Molecular (g/mol)	116
Gravedad Específica (g/cm <sup>3</sup> )	2.9
Tamaño de Partícula Promedio (µm)	9
Area Superficial (m <sup>2</sup> /g) (BET)	1.3
Índice de refracción	1.63
pH (10%)	9.9
Solubilidad en agua (g/100cc.)	0.0095
Densidad (lbs./cu.ft.)	181
Dureza (Mohs)	4.5
Coefficiente de Expansión (mm/mm/°C)	6.5x10-6
Punto de Fusión (°C) – Teórico	1540
Punto de Fusión (°C) – ASTM D1857	1410

### 3.4. Preparación de los Materiales Sinterizados

Para el proceso de sinterización se molieron 2 g de los materiales en 5 ml de etanol durante 30 min en un molino de bolas de carburo de tungsteno Fritsch Pulverisette 6 planetary mono mill (idar-oberstein, Germany), a una velocidad de 200 rpm. Los materiales molidos se secaron a 120°C para eliminar el etanol y obtener un polvo fino. Se obtuvieron tabletas cilíndricas mediante presión uniaxial de 0.5 g de polvo colocados en un troquel de 10 mm de diámetro, comprimidos en una prensa Carver press Hydraulic Unit 3912 (Carver Inc., Wabash, IN) a una presión de 220 MPa durante 5 min. Los experimentos de sinterización se desarrollaron en un horno de alta temperatura Thermolyne 46100 (Thermolyne, Bubuque, IA) 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 [4].

### 3.5. Preparación del Fluido Fisiológico Simulado (SBF)

La solución SBF se caracteriza por ser una solución supersaturada, por lo que cualquier método de preparación inapropiado puede generar una precipitación en la solución. Por tal razón, en todo momento durante la preparación se debe distinguir una solución transparente, libre de cualquier indicio de precipitación. Si aparece cualquier tipo de precipitado, la preparación debe detenerse, eliminar la solución y empezar de nuevo.

Para preparar 1 L de solución, primeramente, 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. Antes de agregar el cloruro de calcio se añade el 90% de ácido clorhídrico.

Después de agregar el sulfato de sodio, el volumen de la solución se ajustó a 900 mL con agua deionizada, 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  $\approx 2.0 \pm 1.0$ .

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 alcanzó un valor de 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  $37^{\circ}\text{C}$  y se agregó más tris-(hidroximetil)-aminometano hasta alcanzar un valor de pH  $\approx 7.45$  en la solución.

Posteriormente se añadió en gotas la cantidad de HCl 1M necesaria para ajustar el pH  $\approx 7.42$ , agregando de nuevo la cantidad necesaria de tris-(hidroximetil)-aminometano para volver a alcanzar un pH  $\approx 7.45$ , para bajarlo de nuevo hasta pH  $\approx 7.42$  con HCl 1M, repitiendo esta operación hasta que todo el tris-(hidroximetil)-aminometano se agregó a la mezcla, ajustando finalmente el pH  $\approx 7.42$  con HCl 1M.

Finalmente, se retiró de la solución el electrodo de pH, se lavó con agua deionizada y ésta 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 aforando aproximadamente hasta la marca de 1 L.

La solución SBF se formuló a partir de los reactivos y cantidades siguientes [12,14]:

- Cloruro de sodio, (NaCl, 99%, Jaltek, NL, México), 7.996 g/L.
- Bicarbonato de sodio, ( $\text{NaHCO}_3$ , 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 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 0.228 g/L.
- Cloruro de magnesio hexahidratado, ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 99.3%, Jaltek, NL, México), 0.305 g/L.
- Cloruro de calcio, ( $\text{CaCl}_2$ , 97.7%, Jaltek, NL, México), 0.278 g/L.

- Sulfato de sodio, ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 99%, Jalmek, NL, México), 0.071 g/L.
- Ácido clorhídrico, (HCl, Fermont, NL, México), 1M.
- Tris-(Hidroximetil)-aminometano, ( $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$ , 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. Debido a esto, la solución SBF se preparó en un recipiente de plástico, disolviendo las cantidades apropiadas de cada uno de los reactivos en agua deionizada, 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 [3].

### 3.6. Evaluación de las Propiedades Bioactivas

El análisis del comportamiento bioactivo de los materiales sinterizados (tabletas cilíndricas), consiste en evaluar la capa de apatita “neoformada” sobre la superficie de los materiales después de sumergirse en 40 mL de la solución SBF durante 1, 2 y 3 semanas a una temperatura controlada a 37°C. Después de cada periodo de inmersión, los materiales se sacaron de la solución, se lavaron con agua deionizada y se secaron a temperatura ambiente.

### 3.7. Evaluación de la Solubilidad

La solubilidad se evaluó determinando los cambios de concentración de los iones Ca, P y Si, así como los cambios de pH de la solución SBF durante el periodo de inmersión de cada muestra, para esto se utilizó un espectrómetro de absorción atómica (Perkin Elmer Model AAnalyst 400) para el análisis de Ca, un espectrofotómetro ultravioleta-



visible (Thermo Scientific, Evolution 60S) para el análisis de Si y P. Para la medición de pH se utilizó un potenciómetro (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL).

### **3.8. Análisis de las Propiedades Hemolíticas de los Materiales**

Las pruebas de hemolisis de los materiales se desarrollaron de acuerdo al protocolo de la American Society for Testing and Materials (ASTM) standard E2524-08 [76]. Los materiales en forma de polvo se colocaron en contacto directo con fluido sanguíneo, la sangre fue donada por un adulto sano (no fumador) y colocada en tubos Vacutainer con heparina para prevenir coagulación. Se utilizó un estándar de hemoglobina y de cianmetahemoglobina (CMH) para elaborar una curva estándar de calibración que cubriera los rangos de 0.025 a 0.8 mg/mL. La sangre entera de los tubos Vacutainer se sometió a un proceso de centrifugación a 800 g a temperatura ambiente por 15 min para obtener el plasma supernadante. Se preparó una muestra con hemoglobina total en sangre (TBH) con la mezcla de 20  $\mu$ L de sangre entera y 5.0 mL del reactivo CMH. Seguidamente se preparó una muestra con plasma libre de hemoglobina (PFH) agregando 100  $\mu$ L de plasma y 100  $\mu$ L del reactivo CMH. Las muestras se colocaron en un sistema de agitación suave. Se determinó la absorbancia a 540 nm para determinar la concentración de hemoglobina. La muestra con plasma libre de hemoglobina (PFH) debe presentar una concentración menor a 1 mg/mL, en caso contrario la muestra de sangre no es la adecuada para el procedimiento y se necesitaría otra muestra de sangre entera. Los materiales, a diferentes concentraciones (2, 4 y 6 mg/mL) fueron diluidos con DPBS y sangre entera, seguidamente se colocaron en una incubadora con agitación a una temperatura de 37°C durante 3 h. Una solución de Triton X-100 al 10% y una solución de PEG al 40% se utilizaron como control positivo y negativo respectivamente. Seguidamente se centrifugaron las muestras a 800 g durante 15 min y se colectó el supernadante. Se analizó la absorbancia de las muestras a una  $\lambda = 540$  nm y se determinó la concentración de hemoglobina a través de la curva estándar de calibración. Los resultados de las muestras se expresaron como porcentaje de hemolisis [76].

### **3.9. Técnicas de Caracterización**

#### **3.9.1. Análisis térmico**

Para detectar las transformaciones que ocurren en los materiales con la modificación de su temperatura se utilizó el análisis térmico gravimétrico (TGA), en combinación con el análisis térmico diferencial (DTA). Ambos análisis se desarrollaron en un equipo analizador simultaneo DSC-TGA (TA Instruments SDT 2990, New Castle, DE). El intervalo del calentamiento fue de temperatura ambiente hasta 1000°C, a una velocidad de 10°C/min con un flujo de aire de 23 cm<sup>3</sup>/min. Se utilizaron 3 mg de muestra colocados sobre 10 mg de alúmina.

#### **3.9.2. Difracción de rayos-X**

Los patrones de difracción de rayos-X se obtuvieron con un difractómetro de polvos Phillips X' Pert (Phillips Electronics, N.V. Eindhoven, Netherlands), con radiación CuK $\alpha$  (40mA, 45 KV) y una velocidad de barrido de 2°/min variando el ángulo de 2 theta desde 10° hasta 80°.

#### **3.9.3. Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier**

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron con un espectrómetro FT-IR (Thermo Scientific iS50 Nicolet). Las muestras fueron analizadas en modo de transmisión, en el intervalo de 4000-400 cm<sup>-1</sup>.

#### **3.9.4. Espectroscopia de dispersión de energía**

Los espectros de dispersión de energía se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido Philips XL-30 ESEM, (Houston, TX, USA) equipado con un detector de

rayos-X característicos para el análisis cualitativo y semicuantitativo de la composición química de las muestras.

### **3.9.5. Microscopia electrónica de barrido**

Para el análisis de la morfología externa de los materiales se utilizó un microscopio electrónico de barrido: Philips XL-30 ESEM, (Houston, TX, USA). Las micrográficas presentadas se obtuvieron utilizando un recubrimiento Au-Pd a través de un minimetizador por sputtering Quorum modelo SC7620.

### **3.9.6. Microscopia electrónica de transmisión**

Las imágenes de alta resolución 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. Se coloca una gota de esta suspensión en una rejilla de cobre recubierta con carbón.

### **3.9.7. Espectroscopia de absorción atómica**

La cuantificación de los elementos de la solución fisiológica se basó en la metodología establecida por Van Loon y Barefoot (1989) y Gómez-Álvarez (2004). Por medio de la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica por flama, utilizando un equipo de Absorción Atómica Perkin-Elmer AAnalyst 400. Se prepararon curvas de calibración para cada elemento. Las muestras fueron analizadas por triplicado, y se incluyó un blanco de reactivo que se analizó por triplicado [77,78].

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Caracterización de los Materiales Antes del Proceso de Sinterización

##### 4.1.1. Análisis térmico

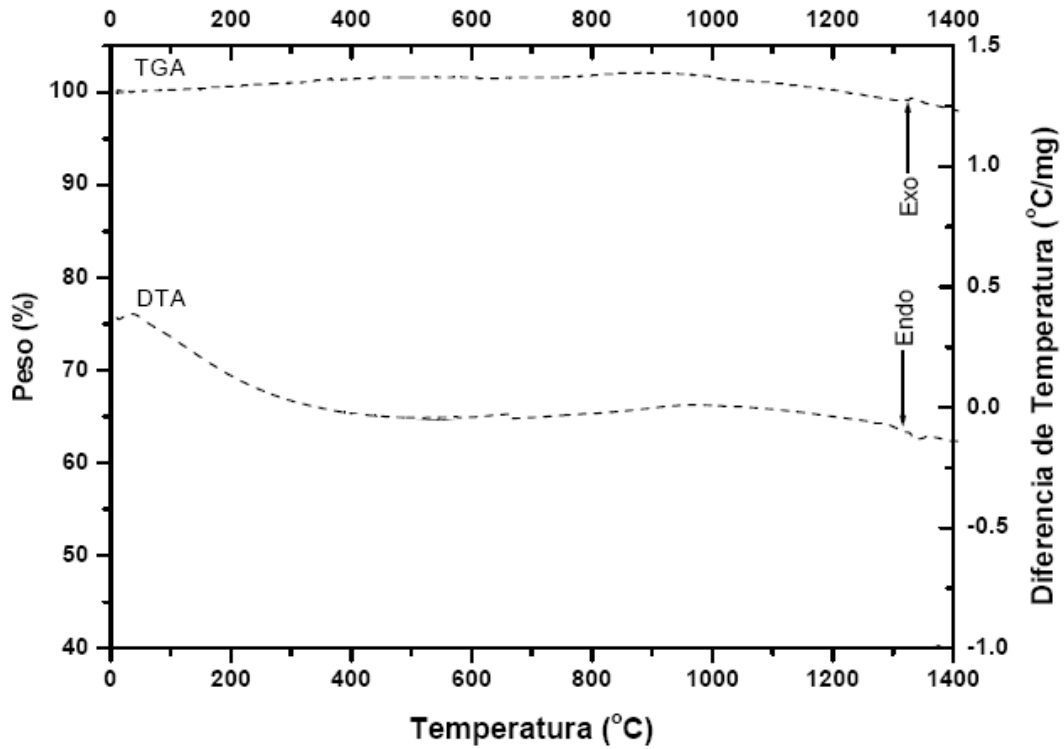
Para conocer el efecto de la temperatura sobre los materiales, se aplicaron técnicas de análisis térmico gravimétrico y térmico diferencial (ATG/ATD), con el objeto de detectar las diferentes etapas de transformación en los geles secos producidos al final de la etapa sol-gel, así como detectar a que temperatura ocurre la transición de las fases polimórficas de la wollastonita,  $\beta$ -wollastonita a  $\alpha$ -wollastonita.

La figura 9 muestra las curvas de análisis térmico gravimétrico (ATG) combinadas con las curvas de análisis térmico diferencial (ATD), para la muestra de wollastonita, tratados térmicamente desde la temperatura ambiente hasta los 1400°C. El gráfico de ATG no muestra señales de pérdida de peso importantes solo un pequeño cambio casi imperceptible a la temperatura entre 1250°C a 1300°C. El gráfico de ATD se mantiene constante hasta la temperatura entre 1250°C a 1300°C donde ocurre un pequeño pico endotérmico característico del cambio de fase de  $\beta$ -wollastonita a  $\alpha$ -wollastonita.

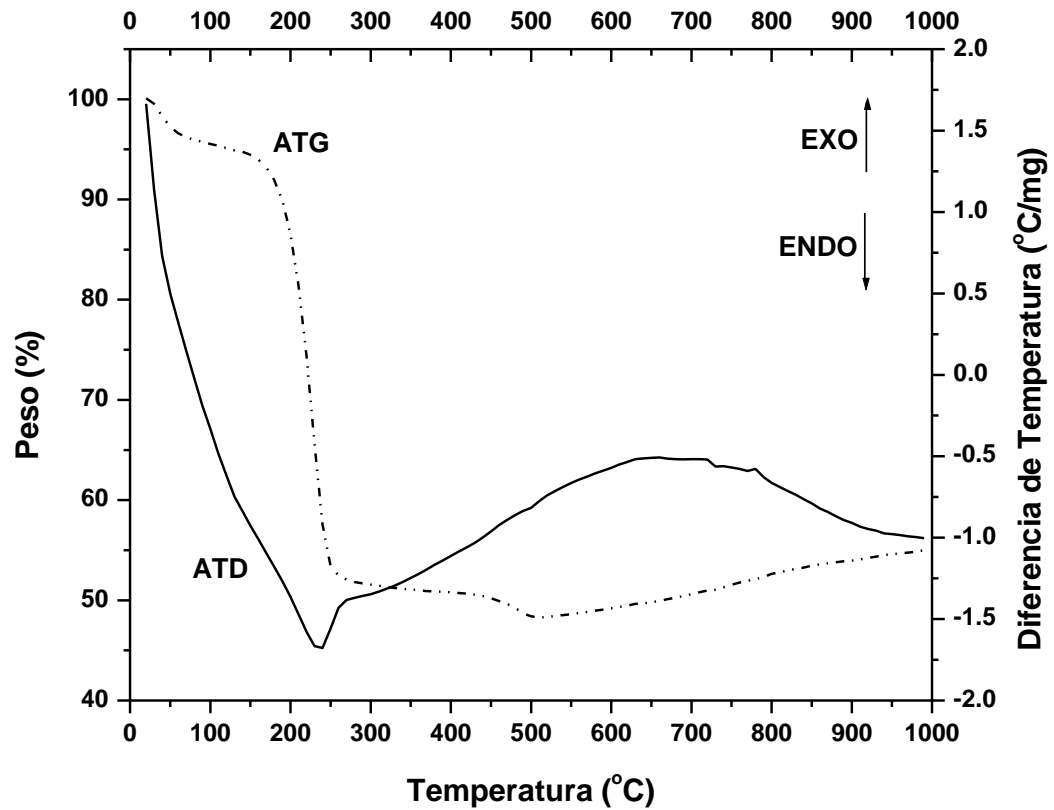
La figura 10 muestra el análisis térmico gravimétrico (TGA) combinado con el análisis térmico diferencial (DTA), para el gel seco de nitrato de calcio y fosfato de amonio desde la temperatura ambiente hasta 1000°C. El gráfico ATG muestra señales de pérdidas en peso de aproximadamente del 2% al inicio del análisis, a partir de la temperatura ambiente hasta 160°C, las cuales pueden ser atribuidas a pérdidas de humedad en el sistema, así como a la evolución de remanentes de los agentes

precursores en el xerogel. En el intervalo de temperatura de 160°C a 350°C ocurre la primera transición térmica importante, la cual corresponde a una pérdida en peso entre 38% a 40%, la cual se encuentra relacionada con un pico endotérmico en la curva ATD aproximadamente a 280°C. Esta transformación pudiera estar relacionada con la formación de hidroxiapatita en las primeras etapas de cristalización. En el intervalo de 500°C a 700°C se muestra un proceso térmico adicional, aunque sin pérdidas de peso de consideración, el cual está relacionado con un pico exotérmico aproximadamente a los 650°C, el cual puede deberse a la aparición de hidroxiapatita en una fase más avanzada de cristalización.

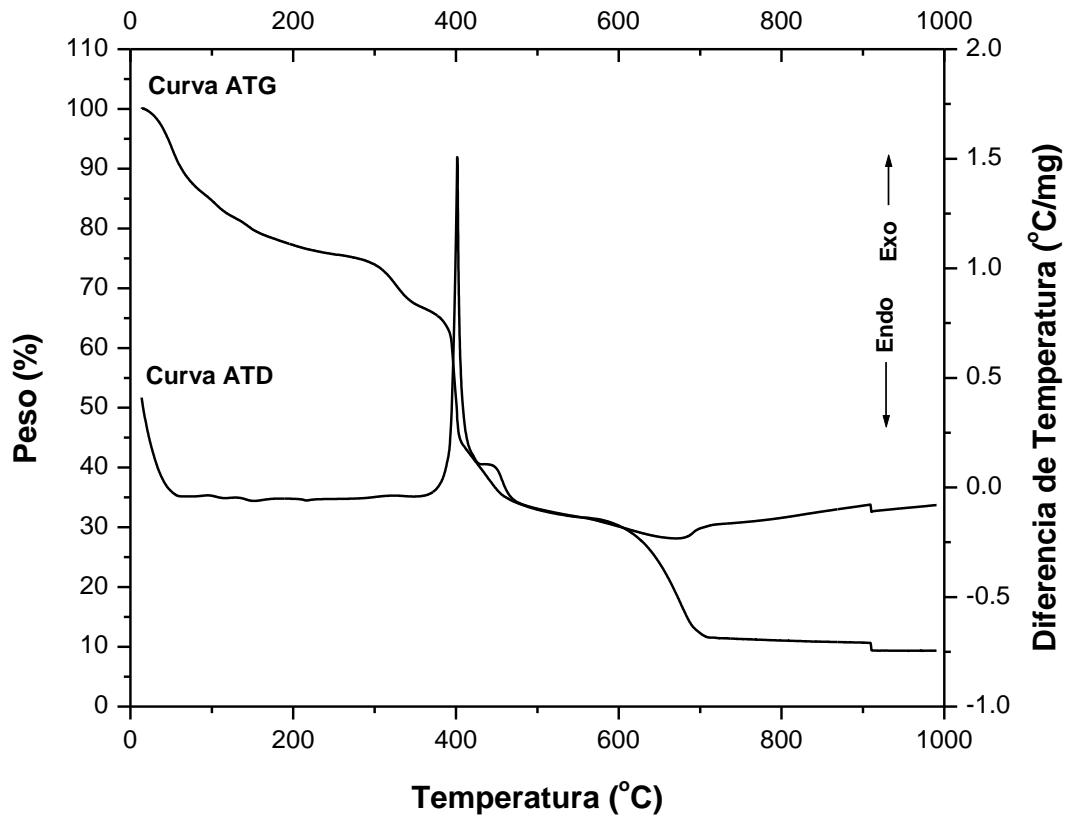
La figura 11 muestra las curvas de análisis térmico gravimétrico (ATG) combinadas con las curvas de análisis térmico diferencial (ATD) para el gel seco producido a partir de acetato de calcio y trietil fosfato inmersos en agua, tratados térmicamente desde la temperatura ambiente hasta 1000°C. En la curva ATG se puede apreciar que durante el intervalo de temperatura de 370°C a 460°C ocurre la primera transición térmica importante, a la cual le corresponde una pérdida en peso entre 28% a 30%, la cual se encuentra relacionada con un pico exotérmico en la curva de ATD, alrededor de 410°C. Esta primera transformación podría estar asociada con la formación de hidroxiapatita y carbonato de calcio en forma de calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) [33,79]. En el intervalo entre 600°C y 700°C se observa una segunda transición térmica, correspondiente a una pérdida de aproximadamente 20% en peso, relacionada con un pico endotérmico alrededor de 640°C, el cual puede deberse a la conversión de carbonato de calcio en óxido de calcio (CaO) [33].



**Figura 9.** Gráficos de ATG-ATD para la muestra de Wollastonita, tratada térmicamente a partir de la temperatura ambiente hasta 1400°C, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.



**Figura 10.** Gráficos de ATG-ATD para el xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente desde la temperatura ambiente hasta 1000°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.



**Figura 11.** Gráficos de ATG-ATD para el xerogel seco obtenido a partir de acetato de calcio y trietil fosfato inmersos en agua, tratado térmicamente desde la temperatura ambiente hasta 1000°C, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

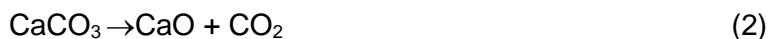


#### 4.1.2. Difracción de rayos-X

La wollastonita natural proporcionada por minera Roca Rodando S. de R.L. de C.V., corresponde a la fase de  $\beta$ -wollastonita, como lo indica el análisis de difracción de rayos-X mostrado en la figura 12, según la tarjeta JCPDS 840654. Durante las curvas de ATG/ATD mostradas en la figura 9 no se observa algún cambio aparente en todo el rango del tratamiento térmico para la wollastonita; sin embargo, se puede apreciar un pequeño proceso térmico entre los intervalos de temperatura de 1250°C y 1300°C, el cual ha sido reportado como el punto de transición de la fase  $\beta$ -wollastonita a la fase  $\alpha$ -wollastonita [29]. Para corroborar lo anterior se trató térmicamente la wollastonita proporcionada por minera Roca Rodando S. de R.L. de C.V. (fase  $\beta$ -wollastonita) hasta 1300°C durante 24 horas. La figura 13 muestra el patrón de difracción de rayos-X para la wollastonita tratada térmicamente hasta 1300°C, en la cual se observa como los planos de difracción cambiaron drásticamente al contrastarlos con los planos de la figura 12, lo cual indica que el material se transformó por completo a la fase  $\alpha$ -wollastonita como lo indica la tarjeta JCPDS 740874.

Las figuras 14 y 15 muestran los patrones de difracción de rayos-X para los xerogeles secos obtenidos a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio después del tratamiento térmico a 350°C y 750°C, respectivamente. La figura 14 muestra como el xerogel tratado a 350°C se transforma en hidroxiapatita en sus primeras etapas de cristalización; por otro lado, el xerogel tratado a 750°C mostrado en la figura 15, se convierte en hidroxiapatita completamente cristalizada. Los análisis mostraron la presencia de hidroxiapatita (JCPDS 09-0432) como fase individual en ambos materiales.

La figura 16 muestra el patrón de difracción de rayos-X para el xerogel obtenido a partir de acetato de calcio y trietil fosfato, tratado térmicamente hasta 1000°C. Durante la síntesis de hidroxiapatita se forma carbonato de calcio en forma de calcita, aproximadamente entre 400-420°C, el cual se descompone en óxido de calcio a una temperatura aproximada de entre 640-700°C, como se describe en la siguiente reacción:



Para eliminar el óxido de calcio presente y producir una hidroxiapatita de forma pura, se desarrolló una etapa de purificación que consistió en lavar el material con una solución diluida de HCl (0.01 M). Con esta etapa se promueve la conversión del óxido de calcio a cloruro de calcio mediante la siguiente reacción:



Aprovechando la alta solubilidad del  $\text{CaCl}_2$  en agua, así como la baja solubilidad de la hidroxiapatita en este medio, se procedió a lavar los materiales con agua deionizada, separando al final el residuo sólido purificado [33]. La figura 16 muestra que efectivamente, el óxido de calcio desaparece del material por la acción de los lavados, dejando a la hidroxiapatita como la fase principal (JCPDS 09-0432). No obstante, si se analiza el patrón de difracción presentado en la figura, se observa la presencia de un pico de difracción aproximadamente a un ángulo  $2\Theta = 29.3^\circ$ , así como el traslape de los planos (211) y (112) a un ángulo  $2\Theta \approx 32^\circ$  del patrón de difracción de la hidroxiapatita. Lo anterior puede ser atribuido a la presencia de hidroxiapatita carbonatada en el producto final [79].

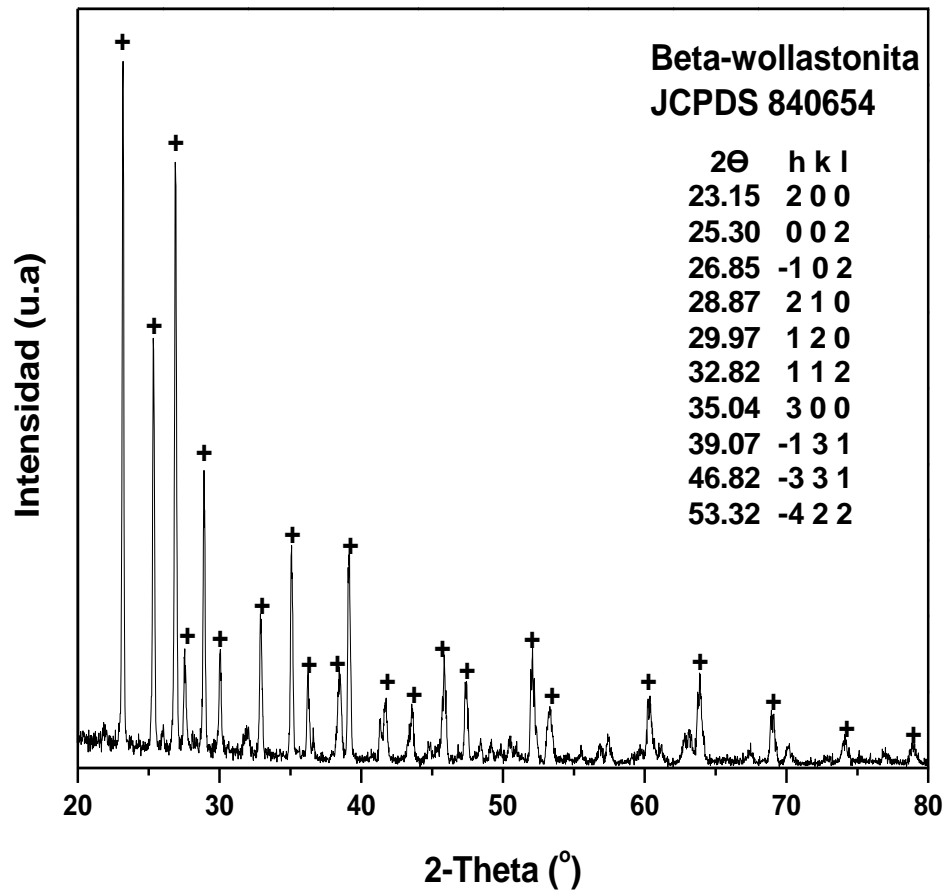


Figura 12. Patrones de difracción de rayos-X de  $\beta$ -wollastonita.

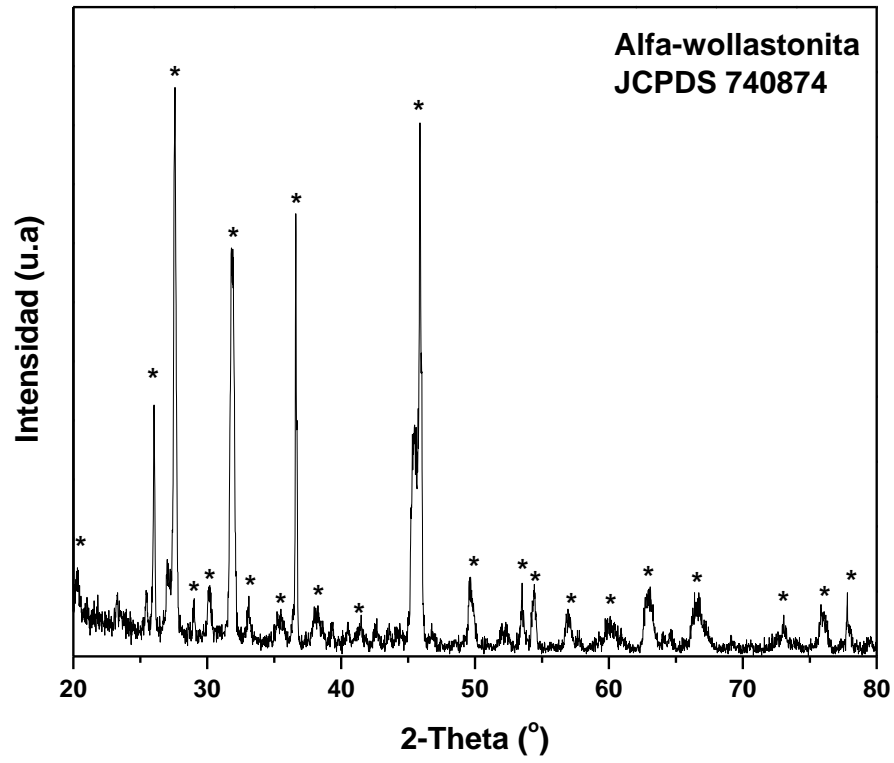
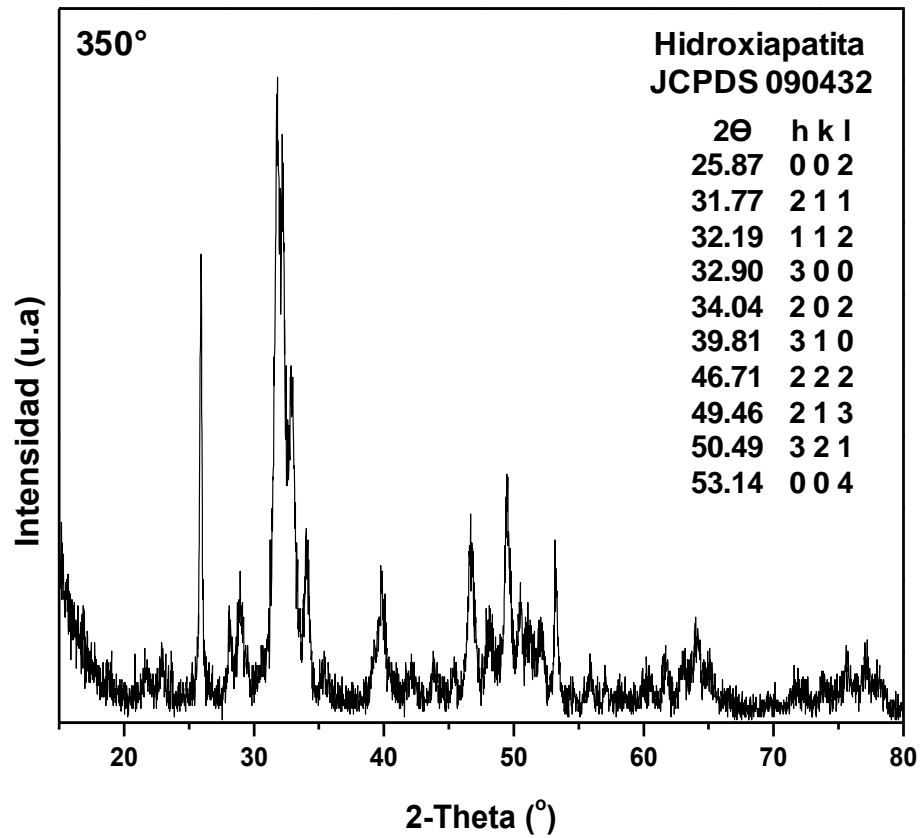
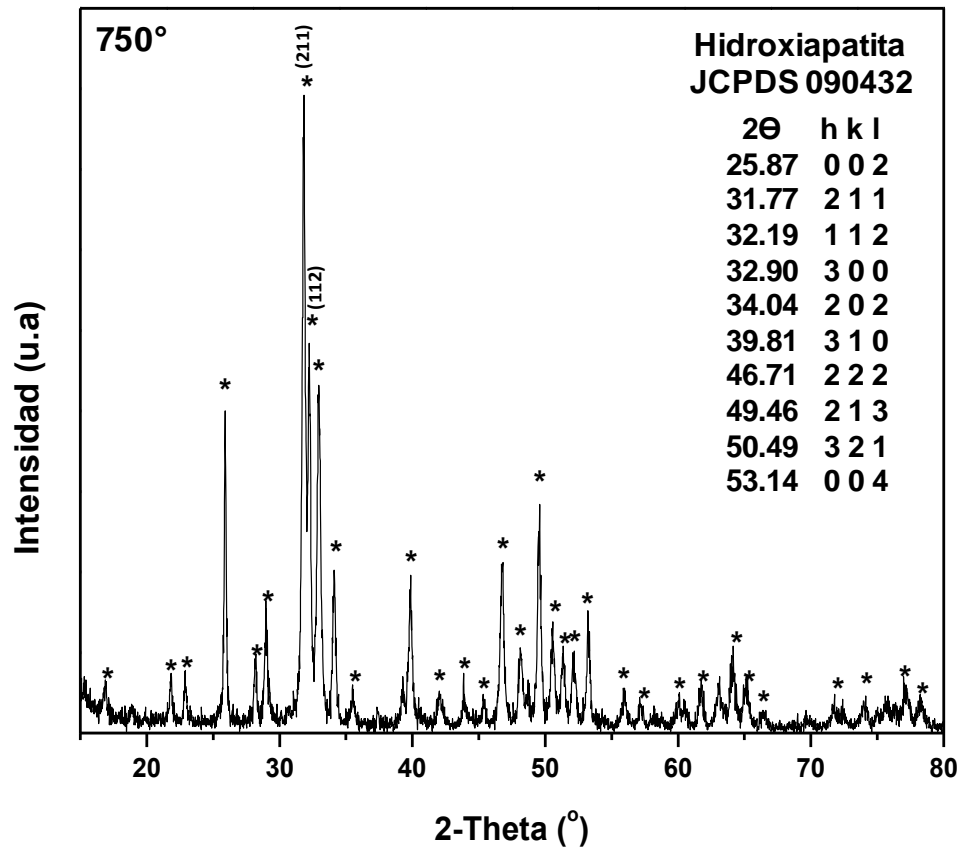


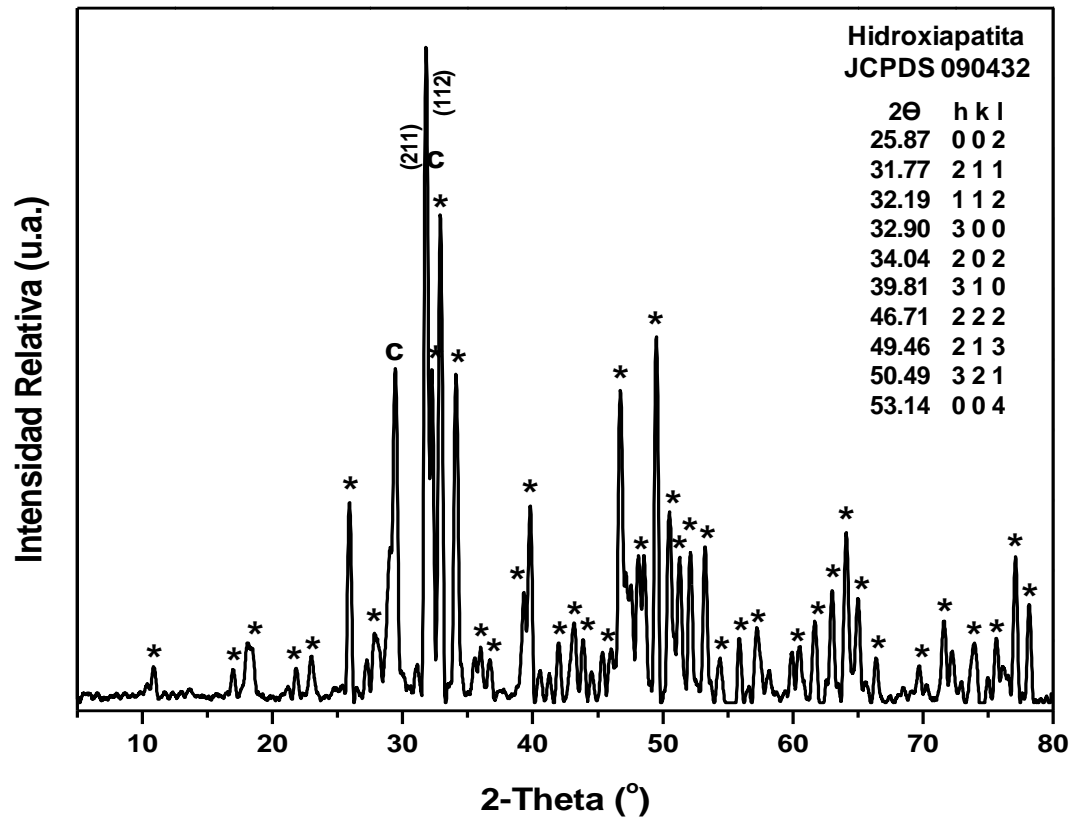
Figura 13. Patrones de difracción de rayos-X de  $\alpha$ -wollastonita.



**Figura 14.** Patrones de difracción de rayos-X del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 350°C.



**Figura 15.** Patrón de difracción de rayos-X del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 750°C.



**Figura 16.** Patrones de difracción de rayos-X del xerogel seco obtenido a partir de acetato de calcio y trietil fosfato inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 1000°C, lavado con HCl 0.01M y agua deionizada. (\*) Hidroxiapatita, (c) Hidroxiapatita carbonatada.

#### 4.1.3. Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier

La figura 17 muestra los espectros FT-IR correspondiente a los polvos de wollastonita natural, con lo que se corrobora que no se encuentra ninguna clase de contaminación en los polvos y da certeza de la alta pureza de la wollastonita utilizada en la elaboración de los sinterizados, observándose las bandas características entre las bandas  $1100\text{ cm}^{-1}$  y  $890\text{ cm}^{-1}$ , causadas por vibraciones de flexión de los enlaces de silicatos.

La Figura 18 y 19 muestran los espectros FT-IR del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio en agua, tratado térmicamente hasta  $350^{\circ}\text{C}$  y  $750^{\circ}\text{C}$  en el rango de  $4000\text{ cm}^{-1}$  hasta  $400\text{ cm}^{-1}$ . Las bandas observadas alrededor de  $3571\text{ cm}^{-1}$  y  $632\text{ cm}^{-1}$  surgen de los modos de estiramiento y liberación, respectivamente, de los iones  $\text{OH}^-$ . Las bandas a  $1048\text{ cm}^{-1}$  y  $1090\text{ cm}^{-1}$  se han asociado con el modo de estiramiento de los enlaces P-O, y la banda de  $962\text{ cm}^{-1}$  proviene del modo de vibraciones de estiramiento P-O simétrico del grupo de  $\text{PO}_4^{3-}$ . La clara presencia de las bandas a  $603\text{ cm}^{-1}$  y  $571\text{ cm}^{-1}$ , a lo largo del  $632\text{ cm}^{-1}$  confirma la presencia de hidroxiapatita como fase estequiométrica.



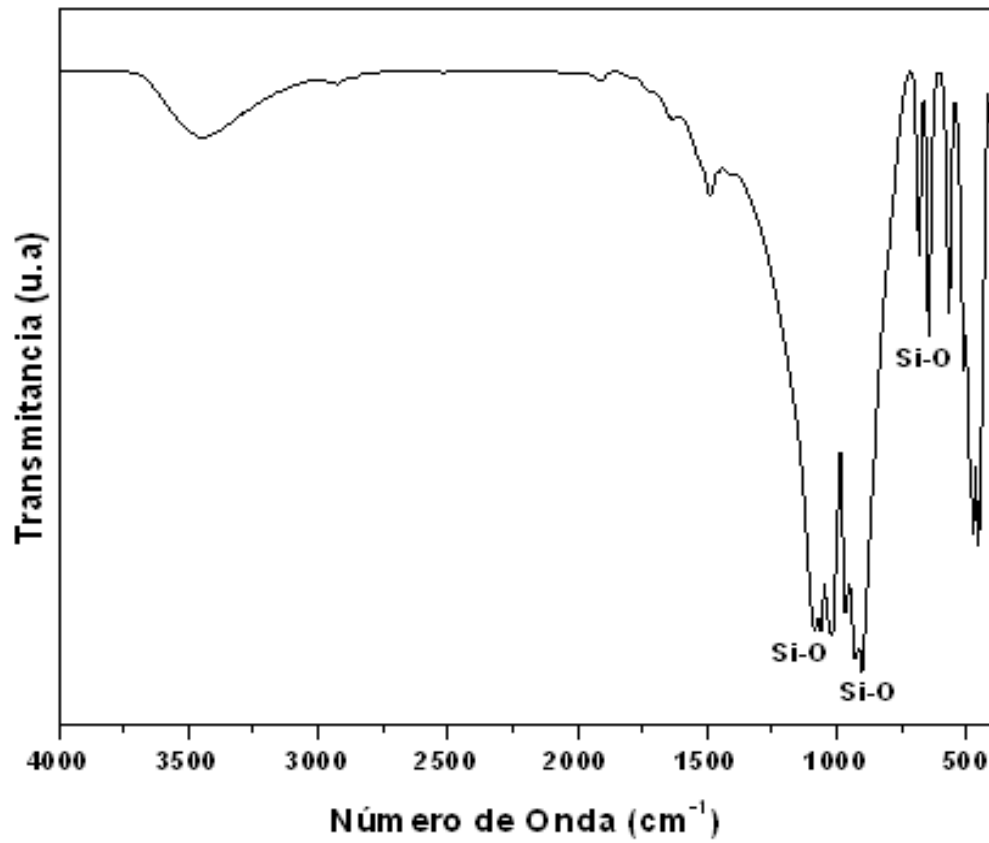
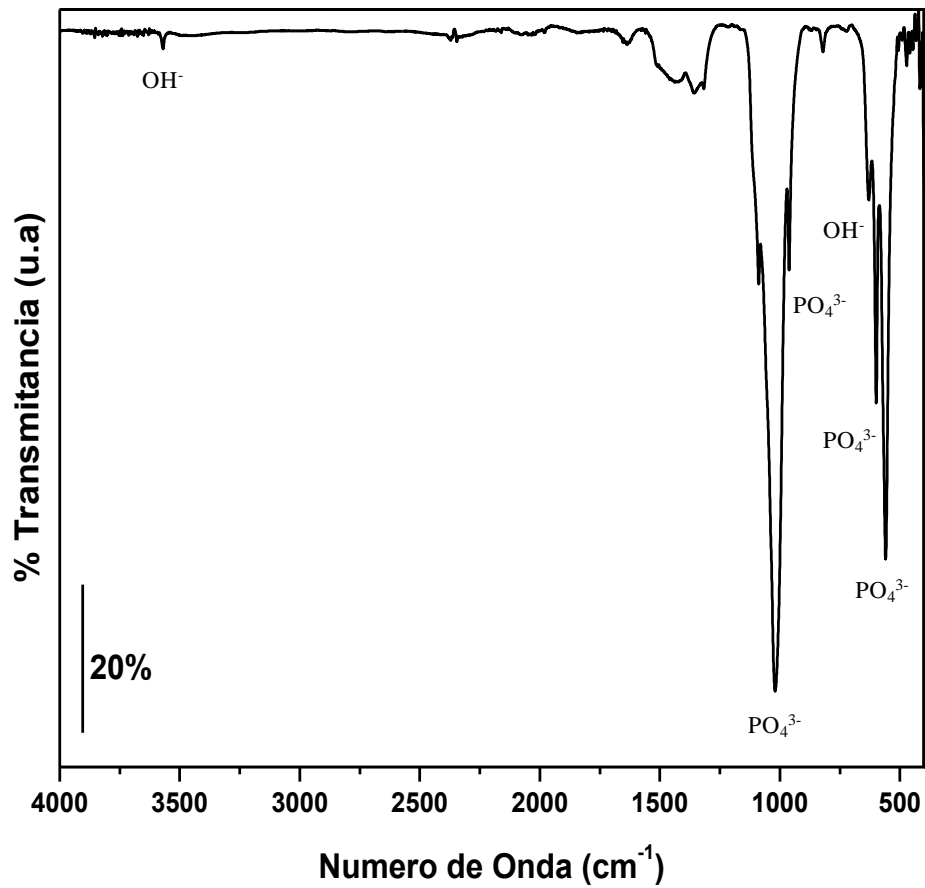
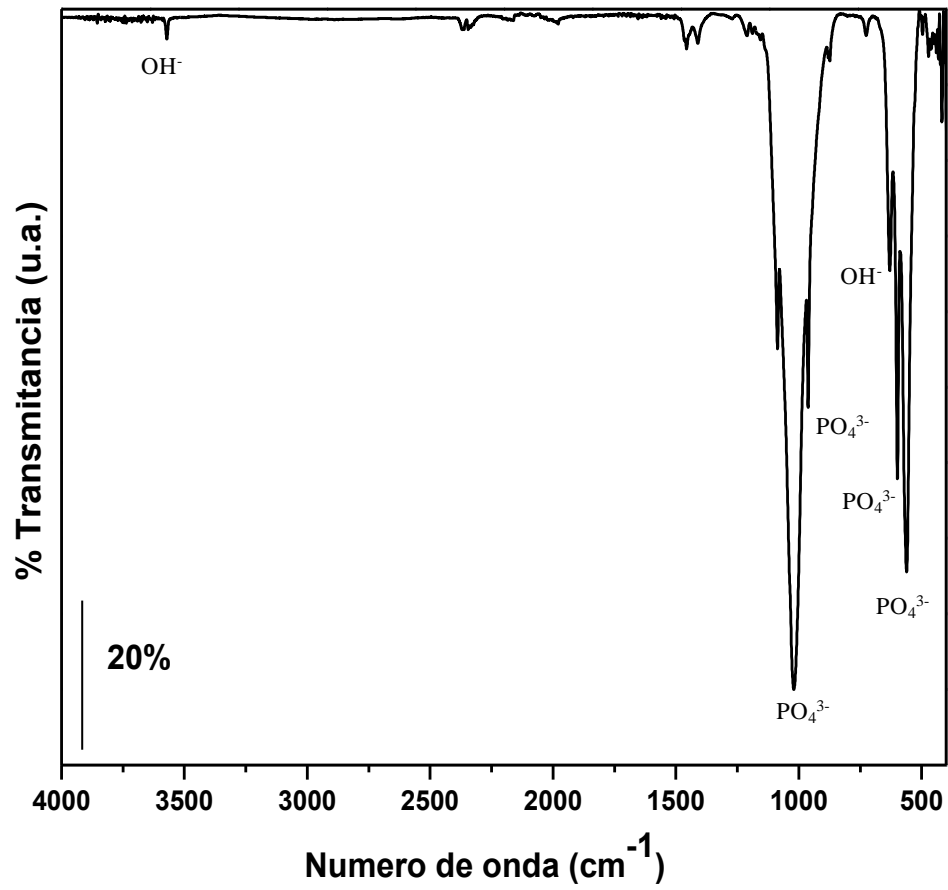


Figura 17. Espectros FT-IR de wollastonita natural NYAD-M200 Minera Roca Rodando, S. de R.L. de C.V.



**Figura 18.** Espectros FT-IR del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 350°C.



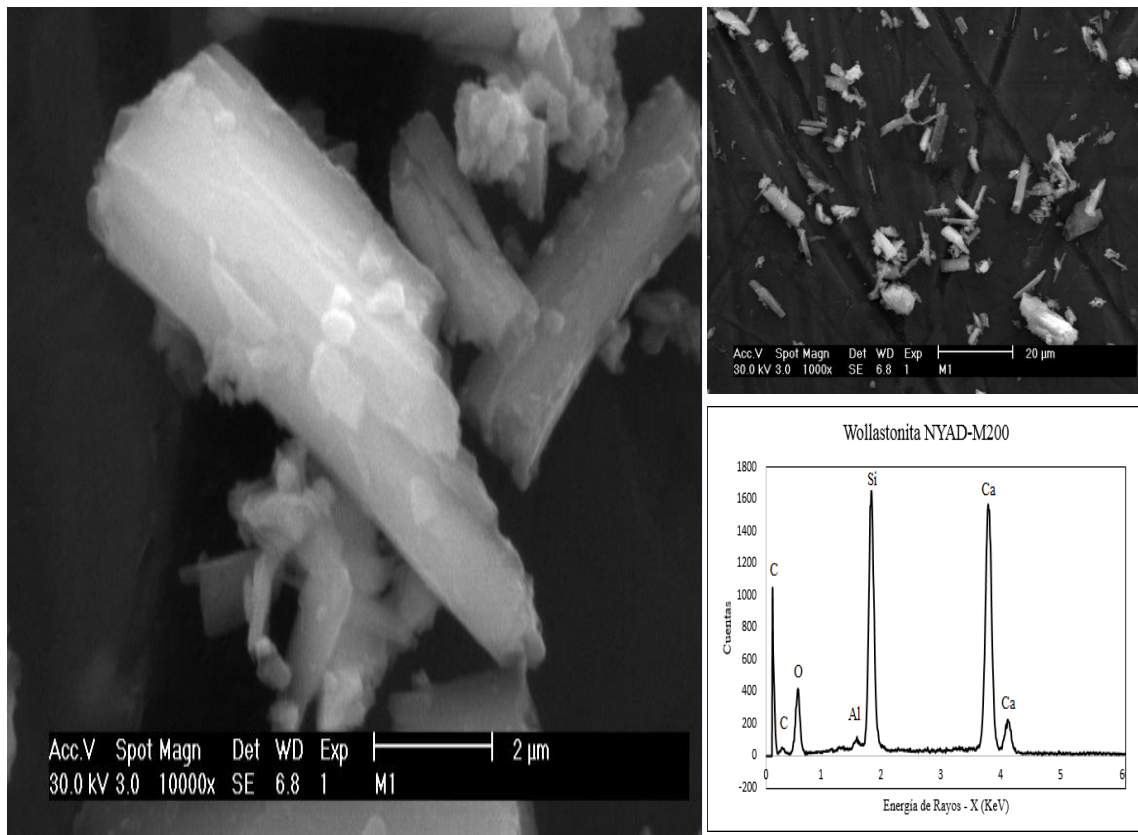
**Figura 19.** Espectros FT-IR del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 750°C.

#### 4.1.4. Microscopia electrónica de barrido

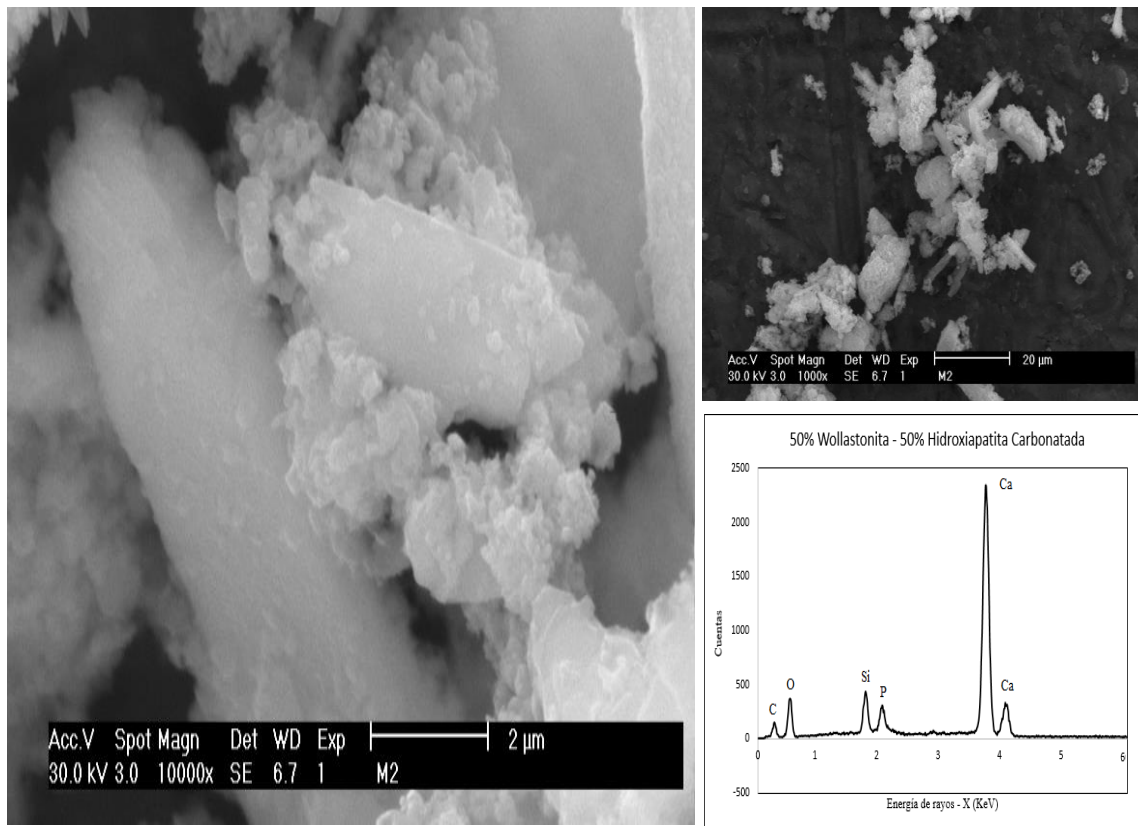
La figura 20 muestra las imágenes del microscopio electrónico de barrido a 2 diferentes aumentos 2  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$ , así como los espectros EDS para la wollastonita antes del proceso de sinterización. Se puede apreciar la forma acicular característica de este material, esta acicularidad es de gran relevancia ya que después de la carga de prensado y de la sinterización estas agujas se distribuyen de tal forma que pueden dar lugar a la formación de poros en los materiales sinterizados los cuales son de gran importancia para permitir la circulación de fluidos fisiológicos a través del material, haciendo más eficiente la bioactividad del mismo. El análisis de espectroscopia de dispersión de energía (EDS) de la superficie del material muestra claramente los constituyentes químicos de la wollastonita Ca, Si y O, lo cual confirma la pureza del material.

La figura 21 muestra las imágenes del microscopio electrónico de barrido a 2 diferentes aumentos 2  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$ , así como los espectros EDS para el compuesto  $\beta$ -wollastonita 50-50 hidroxiapatita carbonatada antes del proceso de sinterización, donde se muestra a las partículas de wollastonita actuando como un sustrato recubierto por partículas de hidroxiapatita. Asimismo, se puede observar una interacción eficiente de ambos materiales en el compuesto. El análisis de espectroscopia de dispersión de energía (EDS) detectó los elementos Ca, Si, P y O, los cuales corresponden a la wollastonita-hidroxiapatita.

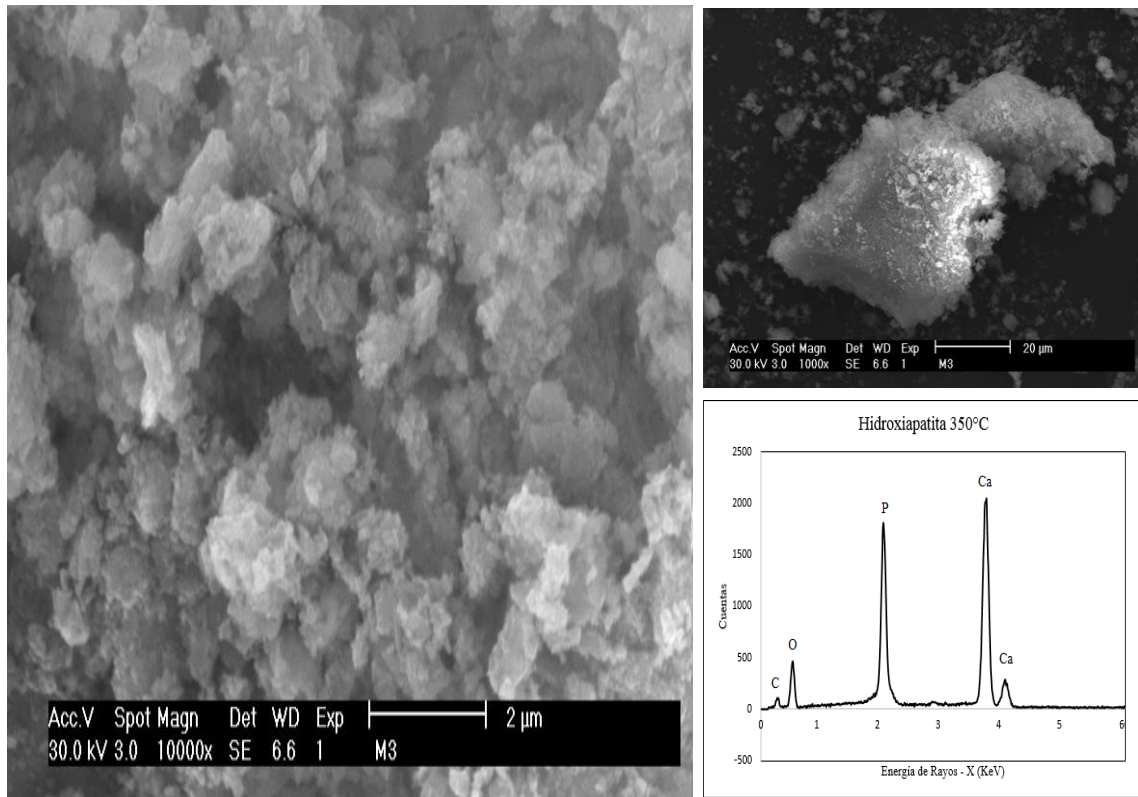
Las figuras 22 y 23 muestran las imágenes del microscopio electrónico de barrido a 2 diferentes aumentos 2  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$ , así como los espectros EDS para los xerogeles secos obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente a 350°C y 750°C, respectivamente. El material tratado a 750°C muestra partículas con una morfología bien definida, con granos redondeados y bastante homogéneos producto de un material totalmente cristalizado. Por otro lado, el material tratado a 350°C presenta partículas con una morfología irregular producto de un material en sus primeras etapas de cristalización. En ambos casos el análisis de espectroscopia de dispersión de energía (EDS) detecto los elementos Ca, P y O correspondientes a la hidroxiapatita.



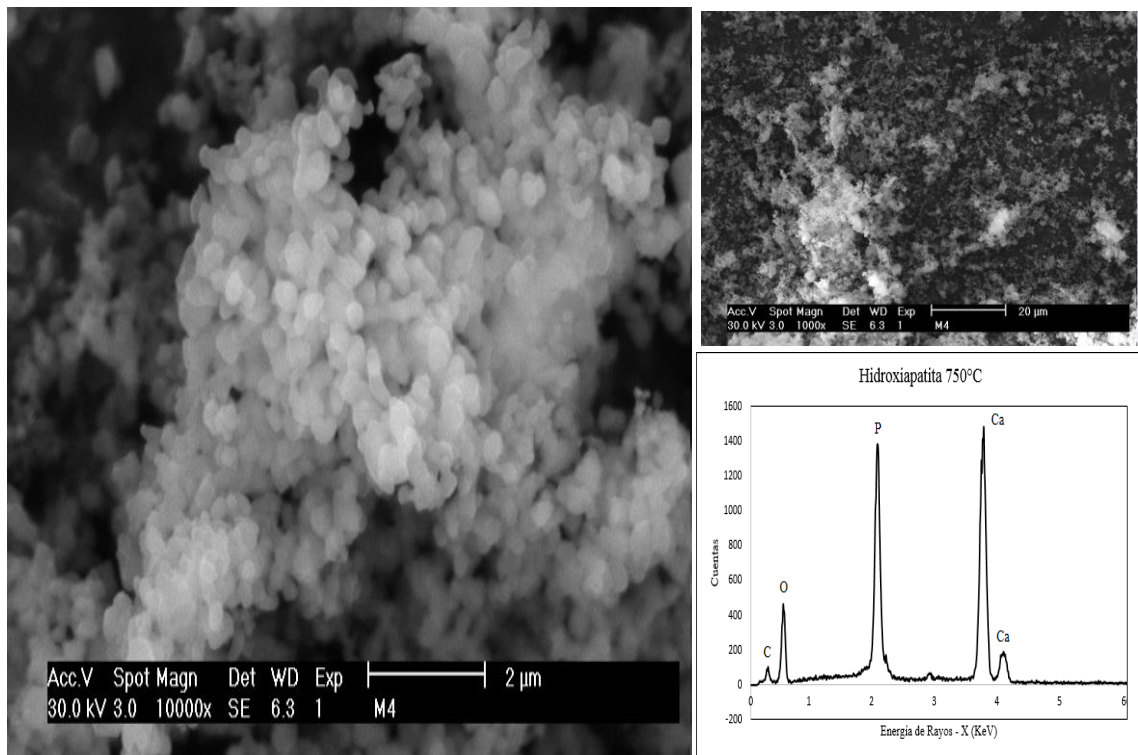
**Figura 20.** Microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectros EDS de Wollastonita natural NYAD-M200 Minera Roca Rodando, S. de R.L. de C.V.



**Figura 21.** Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectros EDS del compuesto  $\beta$ -wollastonita 50-50 hidroxiapatita carbonatada obtenida a partir de acetato de calcio y trietil fosfato inmersos en agua, tratados térmicamente hasta 1000°C y lavados con HCl 0.01M y agua deionizada.



**Figura 22.** Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectros EDS del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 350°C.



**Figura 23.** Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectros EDS del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 750°C.



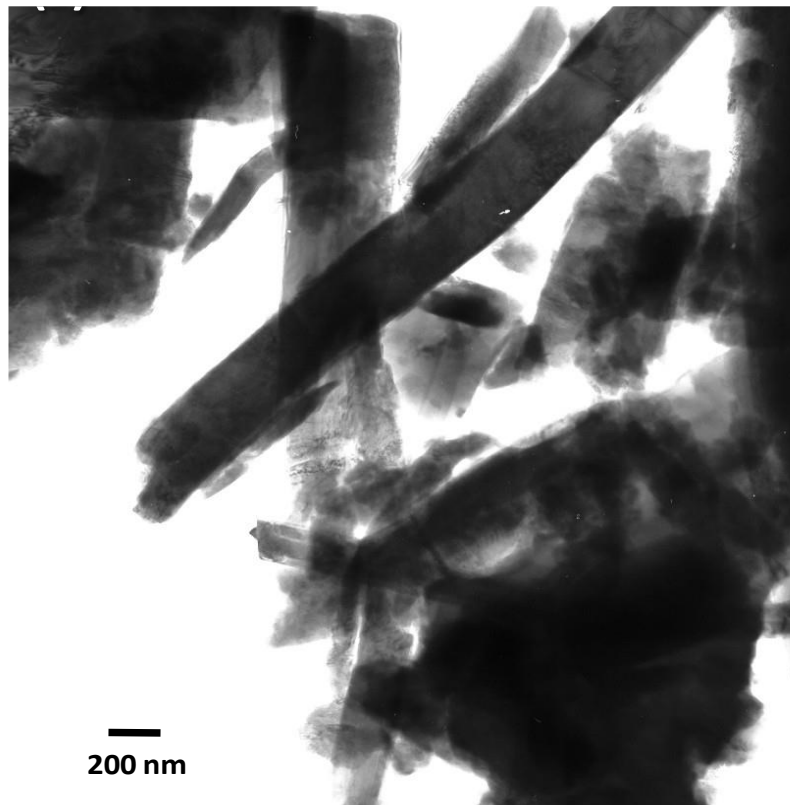
#### 4.1.5. Microscopia electrónica de transmisión

La figura 24 muestra la imagen del microscopio electrónico de transmisión (TEM) para la wollastonita, en la cual se puede observar una forma alargada similar a una fibra típica de este material.

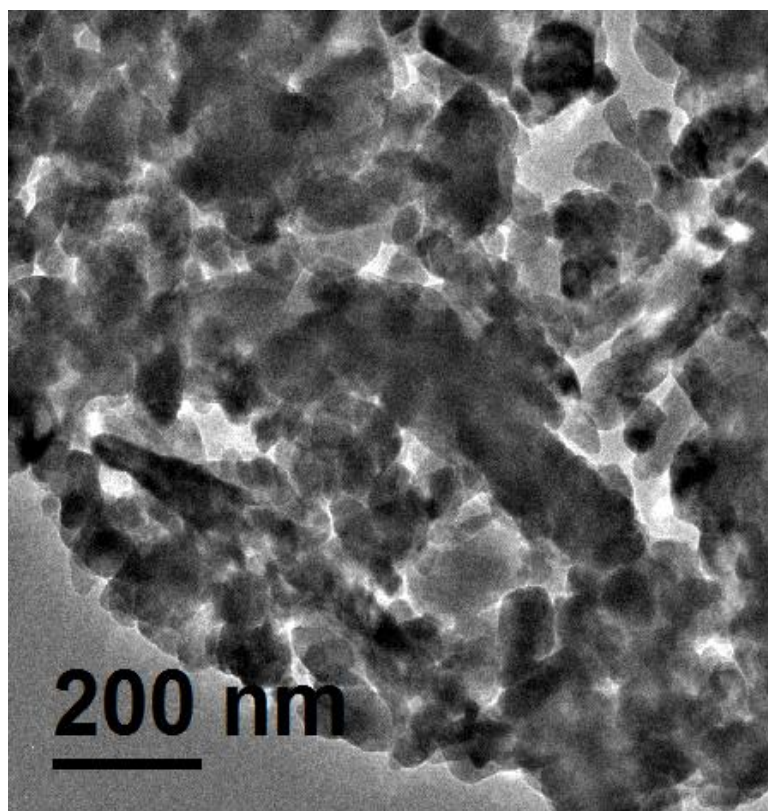
La figura 25 muestra la imagen del microscopio electrónico de transmisión (TEM) para la hidroxiapatita carbonatada obtenida a partir de acetato de calcio y trietil fosfato inmersos en agua, tratados térmicamente hasta 1000°C y lavados con HCl 0.01M y agua deionizada. Se pueden apreciar diversas partículas aglomeradas con morfología definida típica de un material cristalino.

La figura 26 muestra las imágenes del microscopio electrónica de transmisión (TEM) del composito  $\beta$ -wollastonita 50-50 hidroxiapatita carbonatada producida a partir de acetato de calcio y trietil fosfato inmersos en etanol, tratados térmicamente hasta 1000°C y lavados con HCl 0.01M y agua deionizada, Se puede observar observar como los dos materiales están perfectamente integrados en el compósito, las fibras de wollastonita rodeadas de granos de hidroxiapatita, así mismo se aprecia claramente las dos fases del compósito.

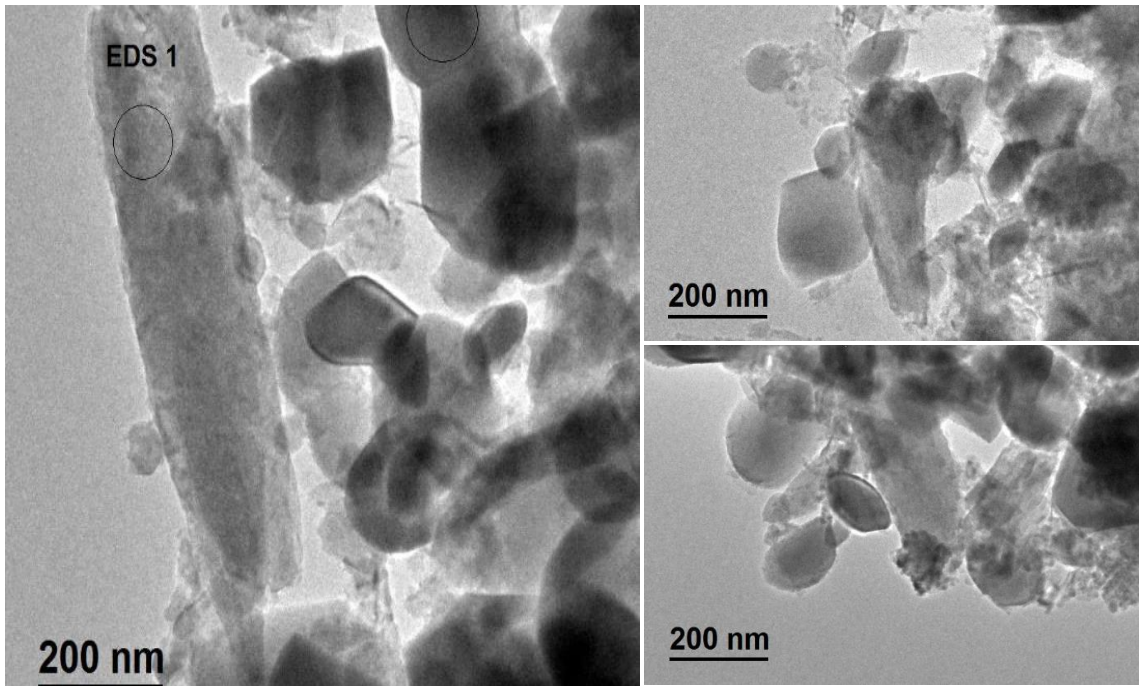
Las figuras 27 y 28 muestran las imágenes del microscopio electrónico de transmisión para los xerogeles secos obtenidos a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratados térmicamente a 350°C y 750°C, respectivamente. El material tratado a 350°C muestra partículas aglomeradas con una morfología irregular. En cambio, el material tratado a 750°C muestra partículas bien definidas con una morfología redondeada.



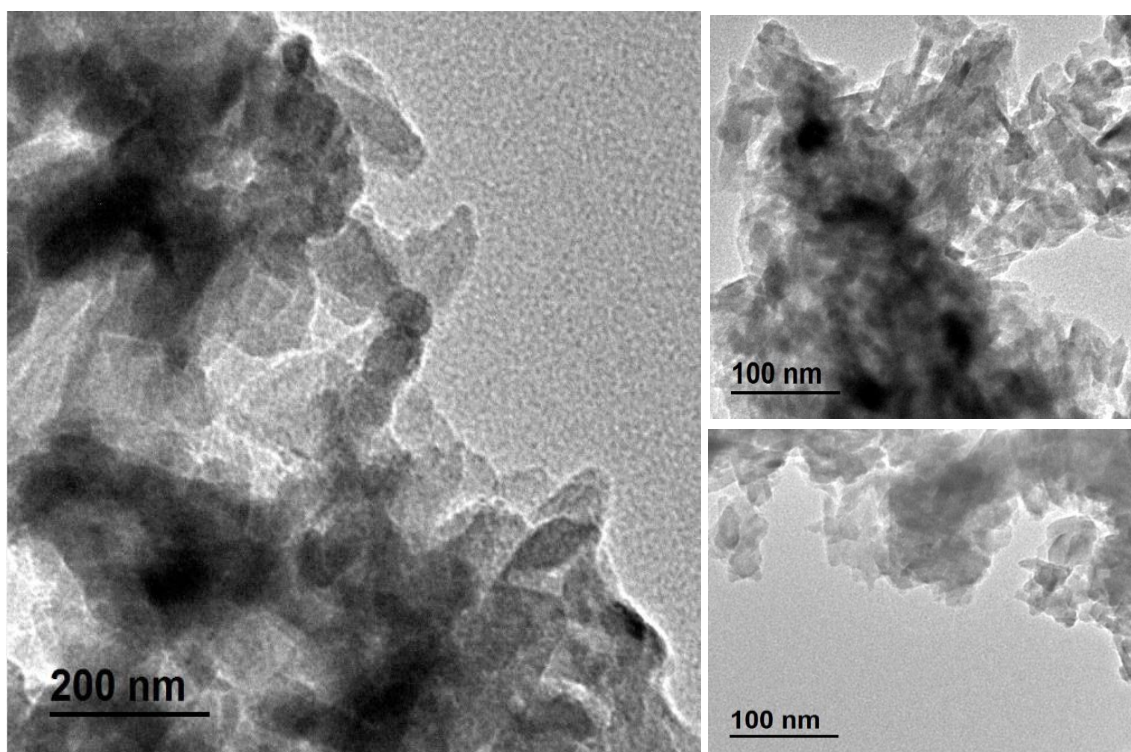
**Figura 24.** Microscopia electrónica de transmisión de Wollastonita natural NYAD-M200 Minera Roca Rodando, S. de R.L. de C.V.



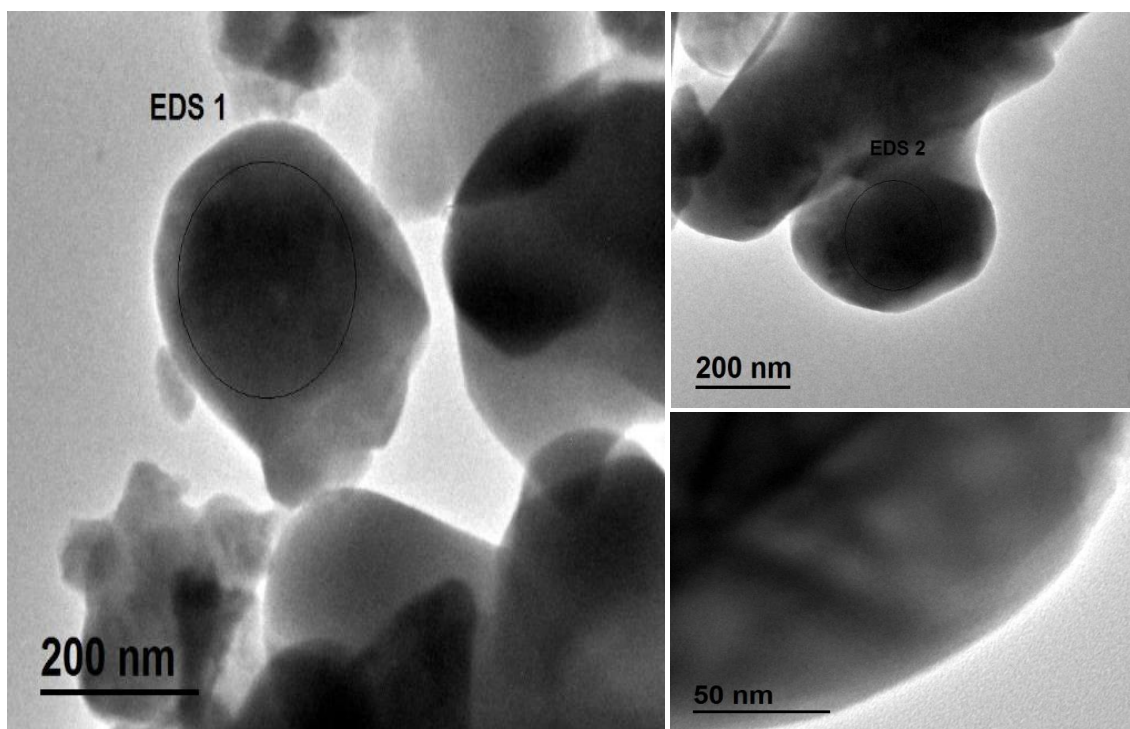
**Figura 25.** Microscopia electrónica de transmisión de hidroxiapatita carbonatada obtenida a partir de acetato de calcio y trietil fosfato inmersos en agua, tratados térmicamente hasta 1000°C y lavados con HCl 0.01M y agua deionizada.



**Figura 26.** Microscopia electrónica de transmisión (TEM) del compuesto  $\beta$ -wollastonita 50-50 hidroxiapatita carbonatada producida a partir de acetato de calcio y trietil fosfato inmersos en agua, tratados térmicamente hasta 1000°C y lavados con HCl 0.01 M y agua deionizada.



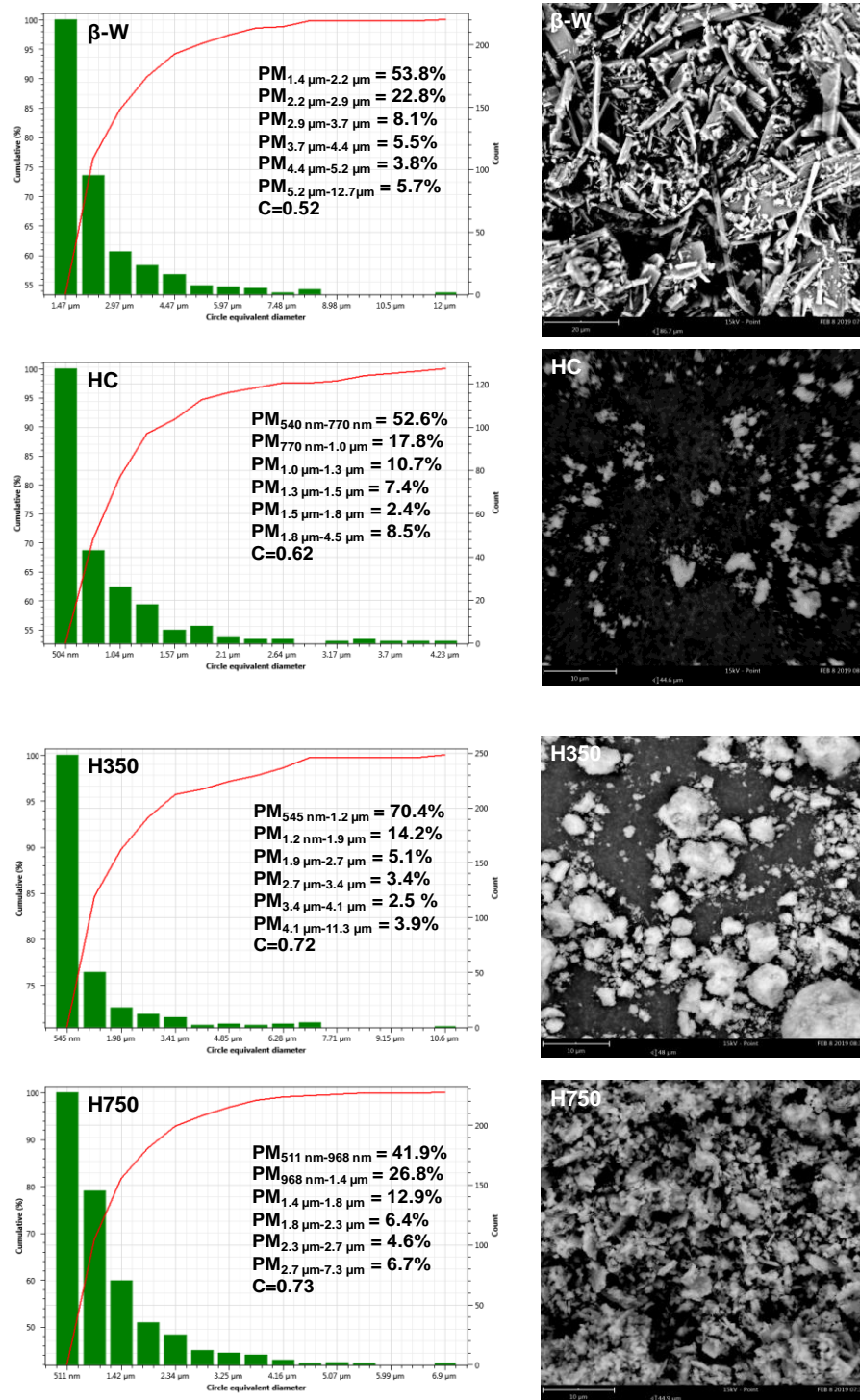
**Figura 27.** Microscopia electrónica de transmisión (TEM) del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 350°C.



**Figura 28.** Microscopia electrónica de transmisión (TEM) del xerogel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente hasta 750°C.

#### 4.1.6. Distribución del tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula obtenida por SEM (software particles metric) de los materiales en polvo se muestra en la figura 29. Los resultados en los tamaños de partícula son los siguientes:  $\beta$ -Wollastonita ( $\beta$ -W) entre 1.4-2.9  $\mu\text{m}$  (76.6%), Hidroxiapatita carbonatada (HC) entre 504 nm - 1.0  $\mu\text{m}$  (70.5%), Hidroxiapatita 350 (H350) entre 545 nm - 1,9  $\mu\text{m}$  (84,6%) e Hidroxiapatita 750 (H750) entre 511 nm - 1,8  $\mu\text{m}$  (81,6%). Estos valores indican que el material de tamaño de partícula más pequeño es la hidroxiapatita carbonatada. En cuanto a los valores de circularidad (C) o redondez, los resultados fueron los siguientes: teniendo en cuenta el valor de 1 para un círculo [80],  $\beta$ -W (0.52), HC (0.62), H350 (0.72) y H750 (0.73). Es importante conocer estos parámetros ya que diversos trabajos de investigación los relacionan con afectaciones en la membrana de los glóbulos rojos provocando su degradación y liberación de hemoglobina desde el interior (hemólisis) [81,82].



**Figura 29.** Distribución de tamaño de partícula de los materiales en forma de polvo, obtenidos a través del análisis por SEM (software particles metric).



## 4.2. Evaluación de las Propiedades Bioactivas de los Materiales Sinterizados

La figura 30 muestra las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido (A) y (B) y espectros EDS (C) y (D) de la superficie del material  $\beta$ -wollastonita, sinterizado a 1200°C y 220 MPa después de 1 y 3 semanas de inmersión en la solución SBF. Se puede observar que los materiales sinterizados presentan una estructura densa con la presencia de poros y cavidades que serán adecuados para la formación de apatita. Durante la primera semana de inmersión (fig. 30A), se observa la presencia de una capa superficial formada por un nuevo material, caracterizada por la aglomeración de pequeñas partículas esféricas. A la tercera semana de inmersión (fig. 30B) el material muestra un crecimiento importante, mostrando aglomeraciones localizadas en esta nueva capa, misma que se denomina “apatita neoformada”, por su semejanza con las apatitas biológicas formadas por los materiales bioactivos al estar en contacto con fluidos fisiológicos. De acuerdo con los espectros EDS, después de una semana en la solución SBF (fig. 30C) los elementos identificados fueron Ca, Si, y O, así como una pequeña cantidad de P. Después de tres semanas de inmersión en la solución SBF los espectros EDS (fig. 30D) los elementos identificados fueron Ca, P, O y C. La presencia de Si ha disminuido considerablemente, esto es debido a la formación de la nueva capa de apatita sobre la superficie del material.

La figura 31 muestra las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido (A) y (B) y espectros EDS (C) y (D) de la superficie del material  $\alpha$ -wollastonita, sinterizado a 1200°C y 220 MPa después de 1 y 3 semanas de inmersión en la solución SBF. A través de las semanas de inmersión en la solución SBF se puede apreciar una capa delgada de apatita neoformada sobre la superficie del material que consiste en pequeñas partículas acumuladas unas sobre otras las cuales van cambiando su consistencia a lo largo de la superficie del material. Los espectros EDS (fig. 31C y D) muestran la presencia de Ca, Si y O, así como una pequeña cantidad de P durante la primera semana, la cual va a ir aumentando durante la tercera semana disminuyendo la presencia de Si.

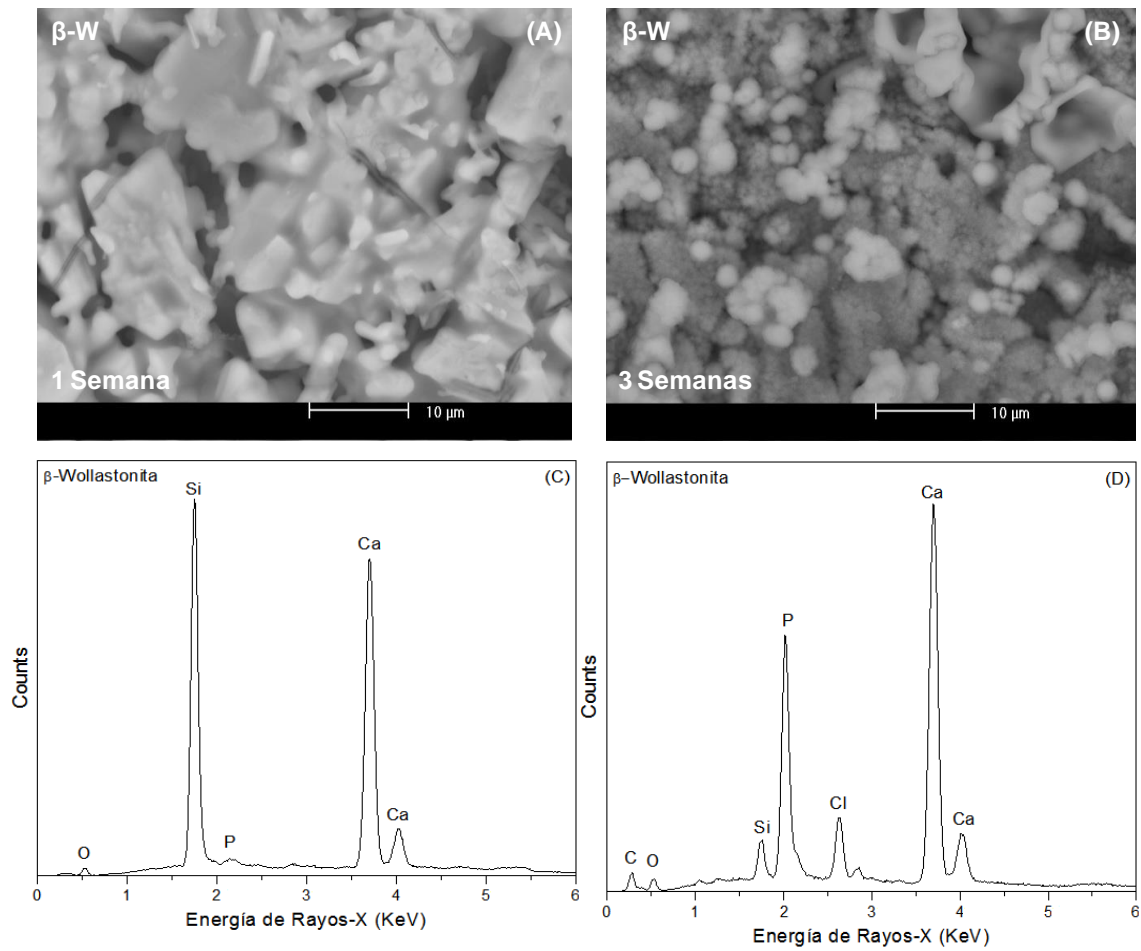
La figura 32 muestra las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido (A) y (B) y espectros EDS (C) y (D) del material compuesto  $\beta$ -wollastonita 50-50 hidroxiapatita carbonatada, sinterizado a 1200°C y 220 MPa después de 1 y 3 semanas de inmersión en la solución SBF. Durante la primera semana de inmersión (fig. 32A) el material muestra una gran bioactividad formando sobre su superficie la capa de apatita neoformada en una etapa temprana de contacto con el fluido fisiológico simulado (SBF). Durante la tercera semana de inmersión (fig. 32B) el material parece estar completamente recubierto con esta capa de apatita semejante a las apatitas biológicas. Los espectros EDS corroboran este comportamiento bioactivo identificando la presencia de Ca, Si, C, O y P durante la primera semana (fig. 32C). La figura 32D muestra los espectros EDS durante la tercera semana de inmersión en la solución SBF donde se pueden identificar Ca, O, C y una disminución de Si y un aumento en la cantidad de P.

La figura 33 muestra las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido (A)-(D) y espectros EDS (E) y (F) del material hidroxiapatita 350 sinterizado a 1200°C y 220 MPa, después de 1 y 3 semanas de inmersión en la solución SBF. Las imágenes muestran la presencia de poros irregulares con diámetros entre 3-8  $\mu\text{m}$ . Estos poros son importantes para una eficiente bioactividad de los materiales; se observan pequeñas grietas en la superficie del material después de un periodo de inmersión de la solución SBF de tres semanas. Los elementos identificados a través de los espectros EDS (fig. 33A y B) fueron Ca, P y O, los cuales corresponden a la hidroxiapatita.

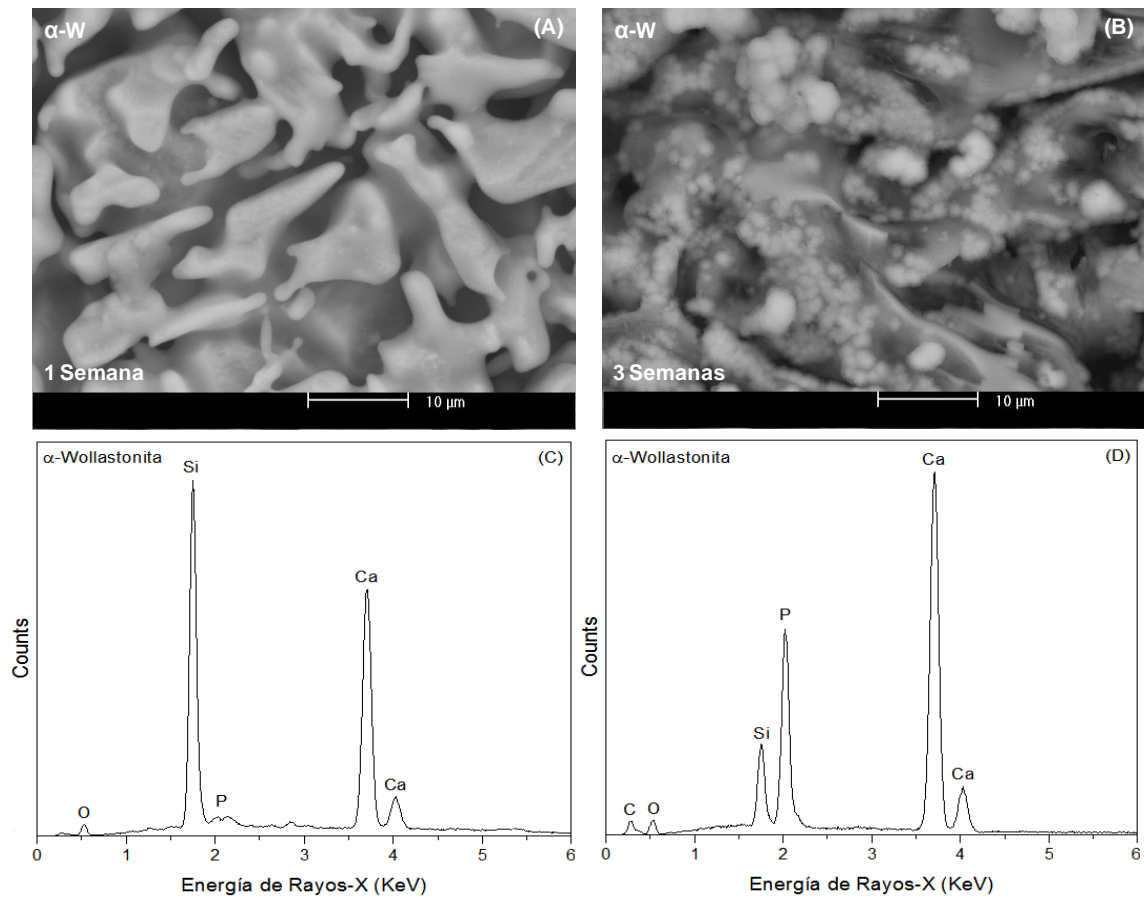
La figura 34 muestra las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido (A)-(D) y espectros EDS (E) y (F) del material hidroxiapatita 750 sinterizado a 1200°C y 220 MPa después de 1 y 3 semanas de inmersión en la solución SBF. El material presenta ciertos poros en su superficie entre los diámetros de 1-5  $\mu\text{m}$ . Después de tres semanas de inmersión en la solución SBF, aparece una capa densa sobre la superficie del material. La textura de esta capa consiste en partículas esféricas aglomeradas sobrepuestas formando cúmulos. La figura 34E y F muestra los espectros EDS de los materiales después de un periodo de inmersión en la solución SBF de 1 y 3 semanas,

en los cuales se detectaron los elementos Ca, P y O correspondientes a la hidroxiapatita.

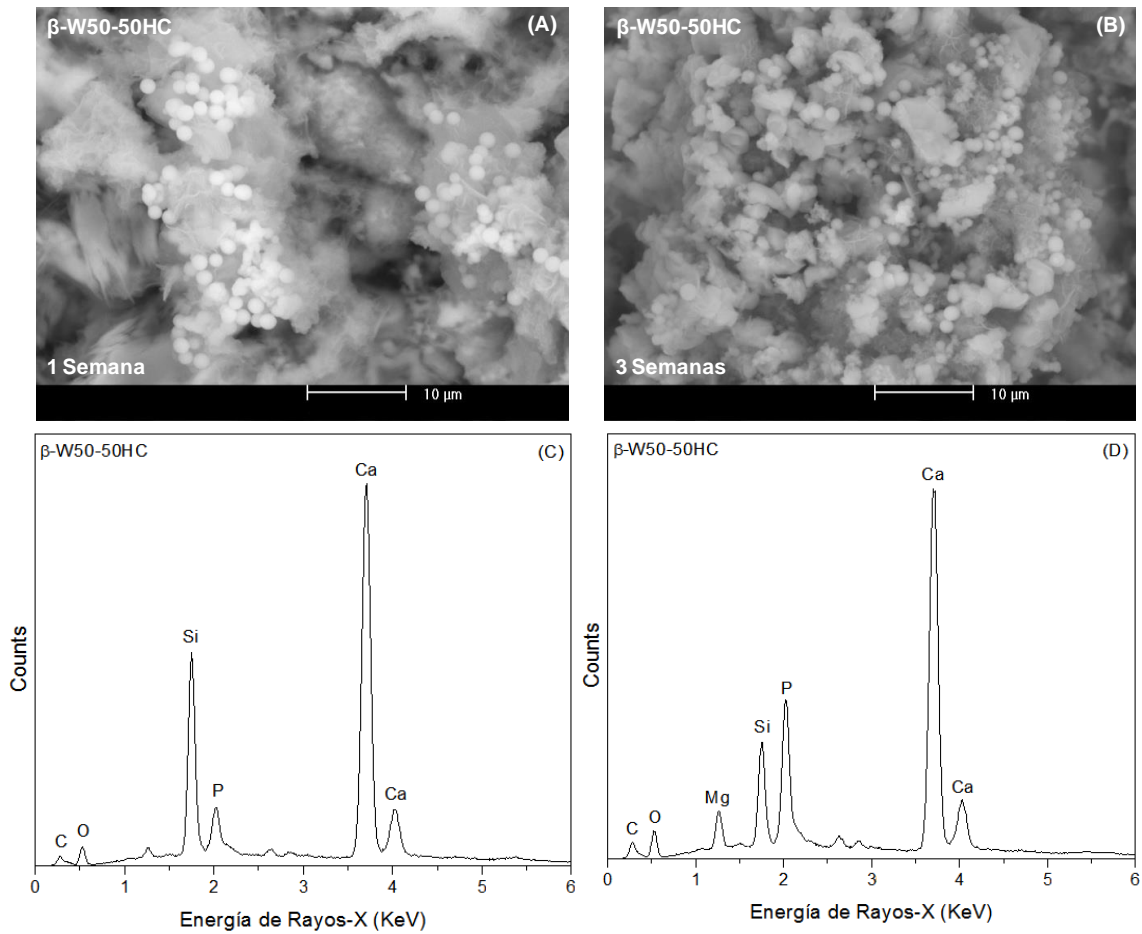
Las diferentes características en el comportamiento para la formación, así como en la textura de las capas de apatita neoformada en los sinterizados indican que los materiales presentan diferente bioactividad y biodegradación, lo cual está directamente relacionado con su microestructura, área superficial y las fases presentes.



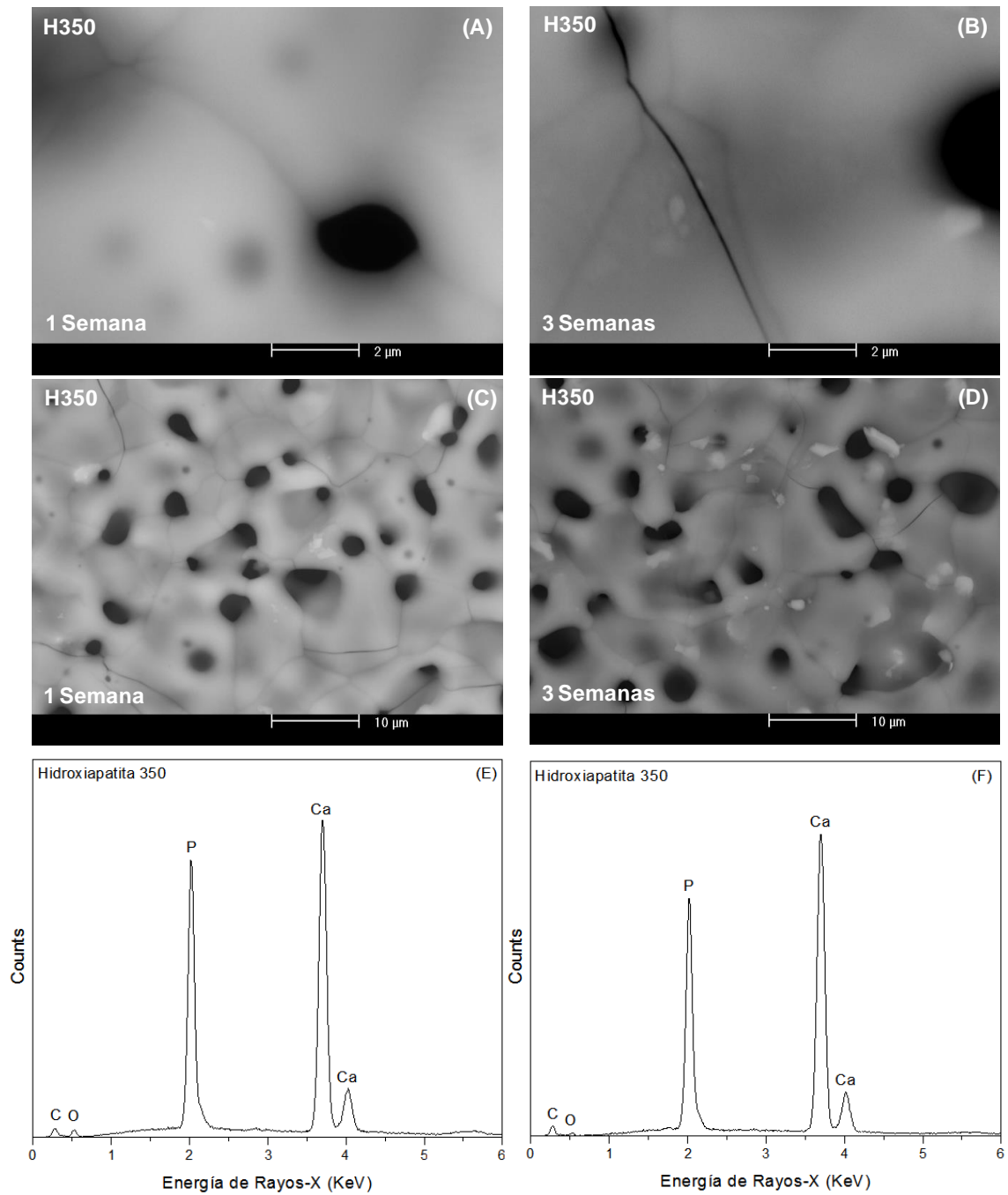
**Figura 30.** Imágenes de microscopio electrónico de barrido (A) y (B) y espectros EDS (C) y (D) del material  $\beta$ -wollastonita sinterizado a 1200°C y 220 MPa, después de 1 y 3 semanas de inmersión en la solución SBF.



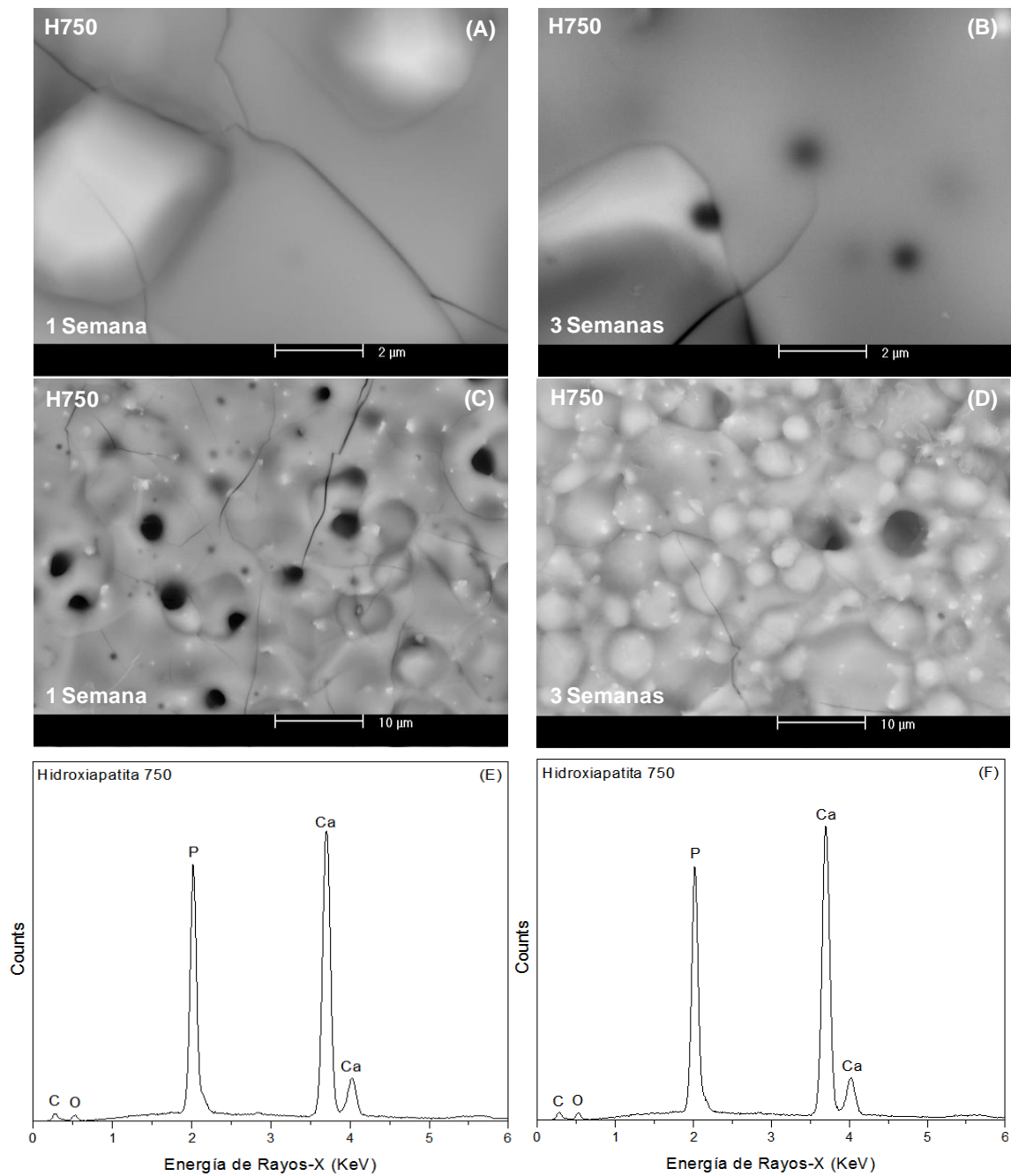
**Figura 31.** Imágenes de microscopio electrónico de barrido (A) y (B) y espectros EDS (C) y (D) del material  $\alpha$ -wollastonita sinterizado a 1200°C y 220 MPa, después de 1 y 3 semanas de inmersión en la solución SBF.



**Figura 32.** Imágenes de microscopio electrónico de barrido (A) y (B) y espectros EDS (C) y (D) del material compuesto  $\beta$ -wollastonita 50-50 hidroxiapatita carbonatada sinterizado a 1200°C y 220 MPa, después de 1 y 3 semanas de inmersión en la solución SBF.



**Figura 33.** Imágenes de microscopio electrónico de barrido (A)-(D) y espectros EDS (E) y (F) del material hidroxiapatita 350 sinterizado a 1200°C y 220 MPa, después de 1 y 3 semanas de inmersión en la solución SBF.



**Figura 34.** Imágenes de microscopio electrónico de barrido (A)-(D) y espectros EDS (E) y (F) del material hidroxiapatita 750 sinterizado a 1200°C y 220 MPa, después de 1 y 3 semanas de inmersión en la solución SBF.



### 4.3. Evaluación de la Solubilidad de los Materiales Sinterizados

La figura 35 muestra la variación en la concentración de Ca, Si y P, así como los cambios de pH en la solución SBF, como resultado de la inmersión de los materiales sinterizados en esta solución, durante 1, 2 y 3 semanas; estos cambios están relacionados con la bioactividad de los materiales.

Para el caso del sinterizado  $\beta$ -wollastonita se observa un aumento en el Si y un decremento en P durante el periodo de inmersión en SBF; con respecto a Ca se observa un incremento en las primeras dos semanas hasta alcanzar la estabilidad durante la tercera semana, logrando alcanzar las 460 ppm, mientras que el pH aumenta alcanzando valores superiores a 8.6 para luego estabilizarse. Los valores alcanzados por el sinterizado de  $\alpha$ -wollastonita para Ca alcanzan las 360 ppm, así como un valor de pH de 8.2. Lo anterior refleja una mayor solubilidad en el sinterizado  $\beta$ -wollastonita, con respecto al de  $\alpha$ -wollastonita a las mismas condiciones.

En el caso de los materiales sinterizados de hidroxiapatita 350 y 750 se observa un decremento en Ca, alcanzado valores de 60 ppm y 90 ppm, respectivamente; mientras que los valores de pH se incrementan en ambos materiales alcanzando la estabilidad alrededor de 7.5. Para el caso de P se observa un decremento desde la primera semana en ambos sinterizados.

El sinterizado compuesto  $\beta$ -wollastonita 50-50 hidroxiapatita carbonatada, muestra un decremento en P, así como un aumento en el Si para luego estabilizarse en 50 ppm. Por lo que corresponde al Ca, éste aumenta significativamente desde la primera semana de inmersión en la solución SBF, hasta alcanzar la estabilidad en 948 ppm; con respecto a los valores de pH, éste aumenta hasta casi alcanzar un valor de 9. El compuesto  $\beta$ -wollastonita 50-50 hidroxiapatita carbonatada presenta la mayor solubilidad con respecto a los otros materiales a las mismas condiciones.

La disolución de iones Ca de los materiales en la solución SBF permite un incremento en el grado de supersaturación local, causando un incremento en el pH de la solución, dando como resultado la precipitación de apatita mediante el consumo de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , y  $\text{OH}^-$ , lo cual se refleja en una disminución en la concentración de los iones P de la

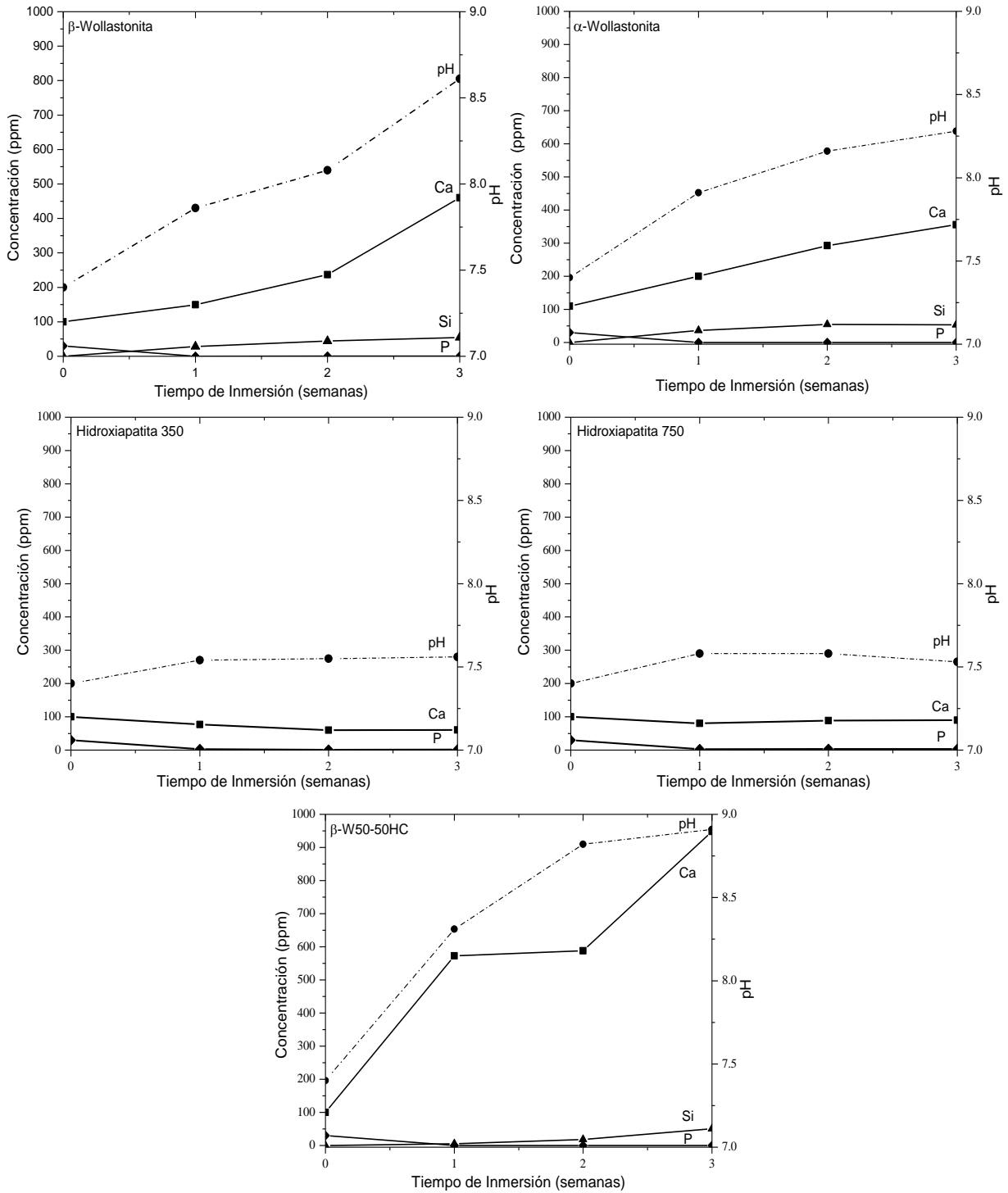
solución SBF [83]. Aunque para la producción de la capa de apatita neoformada se consumen iones Ca, la disolución de estos iones a partir de los materiales es mayor que su consumo. Subsecuentemente, la concentración de iones Ca y Si continúa aumentando mientras que la concentración de iones P continúa disminuyendo, lo cual indica que este ion también es utilizado para la producción de la capa de apatita.

En la wollastonita, la disolución de los iones Ca es más rápida que la de los iones Si. Los iones Ca son liberados hacia la solución, con la cual intercambia iones  $H^+$ , para formar una capa de sílica hidratada sobre la superficie de las fibras de wollastonita, dando lugar a la formación de grupos Si-OH, los cuales han sido reconocidos como catalizadores para la nucleación y crecimiento de la capa de apatita neoformada [84-86].

Por otro lado, la hidroxiapatita sinterizada al ser expuesta a la solución SBF, exhibe una carga superficial negativa, debida a la presencia de los iones fosfato e hidroxilo, la cual permite la interacción con los iones Ca de la solución para formar una capa de fosfato de calcio amorfo “rico” en calcio, con una carga superficial positiva. Esta interactúa con los iones fosfato de la solución, dando lugar a la formación de una capa de fosfato de calcio “pobre” en calcio, la cual se estabiliza cristalizando en la capa de apatita neoformada final [87,88].

Todos los materiales sinterizados, mostraron la habilidad para la formación de una nueva capa de apatita sobre sus superficies al ponerse en contacto con la solución SBF; sin embargo, las diferentes variaciones en la concentración de los iones Ca, P y Si, así como el comportamiento del pH de la solución fisiológica simulada, demuestra que durante las pruebas de inmersión, tiene lugar la disolución superficial de los materiales con un consumo simultaneo de P desde la solución.

Los resultados indican que la solubilidad del compuesto  $\beta$ -wollastonita 50-50 hidroxiapatita carbonatada es superior a la de los otros materiales sinterizados, alcanzándolas 948 ppm para Ca y un pH casi de 9; por otro lado, el menos soluble fue el sinterizado hidroxiapatita 750, alcanzando las 90 ppm para Ca y un pH de 7.5.



**Figura 35.** Variación de la concentración de Ca, P y Si y valores de pH en la solución SBF, cuando los materiales sinterizados a 1200°C y 220 MPa, fueron sumergidos durante 1, 2 y 3 semanas en esta solución SBF.

#### 4.4. Evaluación de las Propiedades Hemolíticas

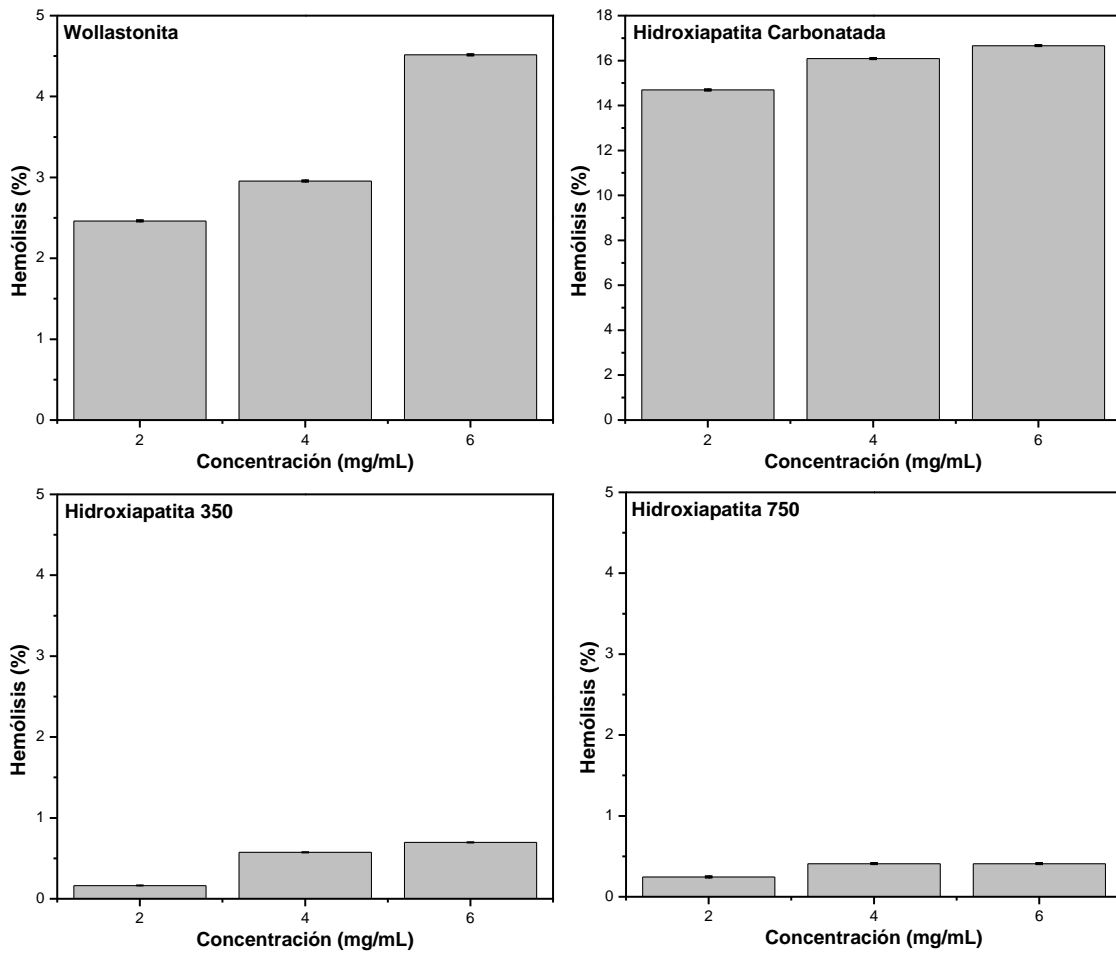
La hemólisis ocurre cuando las células sanguíneas se dañan o destruyen por contacto con ciertas sustancias extrañas. La evaluación de las propiedades hemolíticas de los materiales se desarrollaron de acuerdo al protocolo de la American Society for Testing and Materials (ASTM) standard E2524-08.

La figura 36 muestra los porcentajes de hemólisis de los materiales a 3 diferentes concentraciones 2, 4 y 6 mg/mL. Para la wollastonita el porcentaje más alto (4.5%) de hemólisis se observa con la concentración más alta de 6 mg/mL, el cual no excede el límite máximo de la prueba de 5% de hemólisis, resultando el material no hemolítico. Sorprendentemente la morfología en forma de agujas de la wollastonita no fue un factor suficiente para causar una mayor ruptura en la membrana de los glóbulos rojos, el tamaño de partícula en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) del material podría haber contribuido a obtener este resultado [74]. Trabajos de investigación han demostrado que el grupo silanol (Si-OH) desempeña un papel importante en el proceso de hemólisis [66], éste se encuentra presente en la wollastonita al interactuar con fluidos fisiológicos, confiriéndole una carga superficial negativa, aunque la carga total en la superficie de los glóbulos rojos también es negativa, causado principalmente por las glicoforinas (glicoforinas A) [89,90] que contienen ácido siálico (N-acetilneuroaminico) [91,92]. En algunos lugares de la membrana la wollastonita tiende a vencer las fuerzas de repulsión electrostáticas a través de la carga positiva en los fosfolípidos (conteniendo grupos tetraalkilamonio) presentes en la bicapa lipídica de los glóbulos rojos [93], logrando interactuar directamente con la superficie del material, el cual presenta una morfología acicular, obteniendo los resultados antes mencionados.

Los materiales de hidroxiapatita 350 y 750 presentaron una circularidad (C) y tamaños de partícula similares, aunque con una clara diferencia en su cristalinidad. La superficie redondeada de los materiales no provocó algún daño significativo en la membrana de los glóbulos rojos, debido a que los resultados de los porcentajes de hemólisis fueron menores al 1%. Estos resultados indican que los materiales no son hemolíticos. Asimismo, se puede observar que el factor de la cristalinidad en los materiales no desempeña un papel importante en la actividad hemolítica de la hidroxiapatita

estequiométrica. Otra razón de estos resultados podría atribuirse al poco incremento de los valores de pH durante la inmersión de los materiales en la solución SBF [70,94], alcanzando un máximo de 7.5 después de un periodo de 3 semanas.

El material hidroxiapatita carbonatada tipo-B presento el mayor porcentaje de hemolisis, alcanzado valores entre los rangos de 14-16% a medida que se aumenta su concentración, estos resultados superan el límite máximo de la prueba por lo que el material se considera hemolítico. Esto se debe a que el material presenta una baja circularidad y un tamaño de partícula más pequeño en comparación con los otros materiales evaluados; este último factor aumenta su superficie de contacto y facilita su transporte a través de los fluidos fisiológicos. La atracción electrostática entre los sitios de enlace cargados positivamente en la superficie de la hidroxiapatita carbonatada tipo-B y los grupos cargados negativamente (ácido siálico) en la membrana de los glóbulos rojos es otro factor que influyó para aumentar la interacción entre el material y los glóbulos rojos, provocando una mayor actividad hemolítica.



**Figura 36.** Graficas de los porcentajes de hemólisis de los materiales a 3 diferentes concentraciones 2, 4 y 6 mg/mL.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. CONCLUSIONES

##### 5.1.1. Síntesis de materiales

Se sintetizaron materiales de hidroxiapatita, utilizando dos rutas sol-gel diferentes.

- Se sintetizó hidroxiapatita carbonatada Tipo-B utilizando la ruta I, a partir de acetato de calcio y trietil fosfato como agentes precursores, la cual es la más parecida a la fase biológica de los tejidos óseos.
- Se sintetizó hidroxiapatita estequiométrica utilizando la ruta II, a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio como agentes precursores, se demostró que el material tratado a 350°C se encuentra en las primeras etapas de cristalización y el material tratado a 750°C completamente cristalizado.
- Se sintetizó un compuesto  $\beta$ -wollastonita-hidroxiapatita carbonatada Tipo B, utilizando la ruta I y wollastonita natural de alta pureza como fase de refuerzo.
- Se transformó la fase  $\beta$ -wollastonita a  $\alpha$ -wollastonita a través de un tratamiento térmico a la temperatura de 1300°C. Cada una de estas fases, fueron analizadas como fases únicas.

### 5.1.2 Sinterización de los materiales

- Las condiciones de sinterización, permitieron mantener las fases de los materiales sin transformaciones significativas, así mismo se observó cierto grado de porosidad, indicando que los materiales no son totalmente densos. Este grado de porosidad es importante para asegurar la eficiente integración de estos materiales con el tejido óseo, dando lugar a propiedades bioactivas más eficientes.

### 5.1.3 Evaluación de la bioactividad y solubilidad de los materiales

- El análisis de bioactividad de estos materiales, mediante su interacción con un fluido fisiológico simulado (SBF), durante varios periodos de tiempo, reveló la formación de una capa de apatita neoformada sobre sus superficies, similar a las apatitas biológicas que componen el tejido óseo.
- Mediante las técnicas SEM, EDS, espectroscopia de absorción atómica y colorimetría, se corroboró que la formación de esta capa de apatita, se lleva a cabo mediante un mecanismo de disolución-precipitación.
- La velocidad de disolución y la consecuente precipitación, en el proceso de formación de apatita sobre la superficie de los materiales, resultó más rápida en la superficie del compuesto  $\beta$ -wollastonita-hidroxiapatita carbonatada en relación con la superficie de los otros materiales.

Es importante señalar en los resultados de este trabajo de investigación, que los materiales presentarán diferentes comportamientos en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, al incorporarse como un biomaterial en un organismo vivo, destacando como ejemplo que el compuesto  $\beta$ -wollastonita-hidroxiapatita carbonatada es más soluble en relación con los otros materiales, al estar en contacto con fluidos fisiológicos, así mismo la nueva capa de apatita neoformada sobre su superficie aparece desde la primera semana de inmersión en la solución SBF de manera importante, destacando la bioactividad de este material compuesto.



#### 5.1.4 Evaluación de las propiedades hemolíticas

- Se evaluaron las propiedades hemolíticas de los materiales de acuerdo al protocolo de la American Society for Testing and Materials (ASTM) standard E2524-08. Destacando tres diferentes valores de concentración 2, 4 y 6 mg/mL.
- De los materiales evaluados únicamente la hidroxiapatita carbonatada Tipo-B resultó hemolítica, sobrepasando los límites máximos de la prueba. Por otro lado, los materiales de hidroxiapatita 350 y 750 obtuvieron los mejores resultados en el porcentaje de hemólisis, menos del 1%.

El proceso de hemolisis es la consecuencia de varias interacciones químicas y físicas entre la superficie de los materiales y la membrana de los glóbulos rojos. El tamaño de partícula, morfología y la composición fueron factores determinantes en la actividad hemolítica.

Tomando en cuenta la interrelación de las propiedades hemolíticas, solubilidad y bioactividad, presentadas en estos materiales, se puede promover la posibilidad de utilizarse no solo como materiales estructurales, sino también como inductores de osteoconducción, en tratamientos de lesiones de los tejidos duros del organismo.

## 5.2. RECOMENDACIONES

- Evaluar las propiedades mecánicas de estos materiales, tales como dureza, módulo de elasticidad y tenacidad a la fractura.
- Desarrollar un análisis cuantitativo de la porosidad en los materiales, y determinar su relación con las propiedades mecánicas y bioactivas.
- Desarrollar un estudio de cultivo celular utilizando células del tejido óseo.
- Desarrollar un estudio *In Vivo* de implantación tisular.
- Diseñar formas preestablecidas de los materiales.

## CAPÍTULO 6

### BIBLIOGRAFÍA

1. Vallet-Regí, M. Ceramics for Medical Applications. The Royal Society of Chemistry. **2001**, 97-108.
2. Hench, L.L.; Splinter, R.J.; Allen, W.C.; Greenlee, T.K. Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramics Prosthetic Materials. J. Biomed. Mater. Res. **1972**, 2 117-141.
3. Kokubo, T.; Takadama, H. How useful is SBF in Predicting *In Vivo* Bone Bioactivity. Biomaterials. **2006**, 27, 2907-2915.
4. Encinas, M.A.; Aguayo, S.; Valenzuela, J.L.; Payan, S.; Castellón, F.F. Mechanical and Bioactive Behavior of Hydroxyapatite-Wollastonite Sintered Composites. Int. J. Appl. Ceram. Technol. **2009**, 2 1-14.
5. Encinas, M.A.; Aguayo, S.; Castillo, S.J.; Castellón, F.F.; Castaño, V.M. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite-Wollastonite Composite Powders by Sol-Gel Processing. Int. J. Appl. Ceram. Technol. **2008**, 5 401-411.
6. 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**.
7. Tortora, P.; Derrickson, B. Principles of Anatomy and Physiology; U.S.A, **2017**; pp 173-184.

8. Kendall, J.B. Biomaterials Research Advances; Nova Science, New York, **2007**, pp 1-19.
9. Pawelec K.M.; Planell J.A. Bone Repair Biomaterials Regeneration and Clinical Application; Mathew Deans/Woodhead: Duxford, United Kingdom, **2019**, pp 65-96.
10. Vallet-Regí, M. Bioceramics with Clinical Applications; Jhon Wiley and Sons, West Sussex, United Kingdom, **2014**; pp 4-15.
11. Hench, L.L. Biomaterials: a Forecast for the Future. Biomaterials. **1998**, 19 1419-1423.
12. Hench, L.L.; West J.K. Biological Application of Bioactive Glasses. Life. Chem. Rep. **1996**, 13 187-241.
13. Jarcho, M.; Bolen, C.H.; Thomas, M.B.; Bobick, J.; Kay, R.H.; Doremus, R.H. Hydroxyapatite Synthesis and Characterization in Dense Polycrystalline Form. J. Mat. Sci. **1976**, 11 2027-2035.
14. Klein, C.P.A.T.; Driessen, A.A.; de Groot, K.; Van den Hooff, A. Biodegradation Behavior of Various Calcium Phosphate Materials in Bone Tissue. J. Biomed. Mat. Res. **1983**, 17 769-784.
15. Aoki, H.; Okayama, S.; Akao, M. Effect of Strontium Content on the Mechanical Properties of Bone and Sintered Hydroxyapatite. Bioceramics. **1991**, 4 87-90.
16. Kay, M.I.; Young, R.A.; Posner, A.S. Crystal Structure of hydroxyapatite. Nature. **1964**, 204 1050-1052.
17. Young, R.A.; Elliott, J.C. Atomic-Scale Bases for Several Properties of Apatites. Arch. Oral. Biol. **1966**, 11 699-707.

18. LeGeros, R.Z. Biodegradation and Bioresorption of Calcium Phosphate Ceramics. *Clin. Mat.* **1993**, 14 65-88.
19. Mayer, I.; Cuisinier, F.J.G.; Gdalya, S.; Popov, I. Tem Study of the Morphology of Mn<sup>2+</sup>-Doped Calcium Hydroxyapatite and  $\beta$ -Tricalcium Phosphate. *J. Inor. Biochem.* **2008**, 102, 311-317.
20. Matsunaga, K. First-Principles Study of Substitutional Magnesium and Zinc in Hydroxyapatite and Octacalcium Phosphate. *J. Chem. Phys.* **2008**, 128 245101.
21. Gibson, I.R.; Bonfield, W. Novel Synthesis and Characterization of an AB-Type Carbonate-Substituted Hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, 59 697-708.
22. Zhou, W.Y.; Wang, M.; Cheung, W.L.; Guo, B.C.; Jia, D.M. Synthesis of Carbonated Hydroxyapatite Nanospheres Through Nanoemulsion. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2008**, 19 103-110.
23. Tonegawa, T.; Ikoma, T.; Yoshioka, T. Hanagata, N.; Tanaka, J. Crystal Structure Refinement of A-Type Carbonate Apatite by X-Ray Powder Diffraction. *J. Mater. Sci.* **2010**, 45 2419-2426.
24. Rey, C.; Collins, B.; Goehl, T.; Dickson, I.R.; Glimcher, M.J. The Carbonate Environment in Bone Mineral: A Resolution-Enhanced Fourier Transform infrared Study. *Calcif. Tissue. Int.* **1989**, 45 157-164.
25. Fihri, A.; Len, C.; Varma, R.S, Solhy, A. Hydroxyapatite: A Review of Synthesis, Structure and Applications in Heterogeneous Catalysis. *Coor. Chem. Rev.* **2017**, 347 48-76.
26. Markovic, S.; Veselinovic, L.; Lukic, M.; Karanovic, L.; Bracko, I.; Ignjatovic, N.; Uskokovic, D. Synthetical Bone-Like and Biological Hydroxyapatites: a

- Comparative Study of Crystal Structure and Morphology. *Biomed. Mater.* **2011**, 6 1-13.
27. Deer, W.A.; Howie, R.; Sussman, J. *Rock Forming Minerals; Single Chain Silicates*. Geological Society. London, **1997**; pp 50-85.
28. Padmanabhan, S.K.; Gervaso, F.; Carrozo, M.; Scalera, F.; Sannino, A. Licciulli, A. Wollastonite/Hydroxyapatite Scaffolds with Improved Mechanical, Bioactive and Biodegradable Properties for Bone Tissue Engineering. *Ceram. Int.* **2013**, 39 619-627.
29. Nuñez, L.A.; Encinas, M.A.; Gomez, A.; Valenzuela, J.L.; Tiburcio, G.C. Evaluation of Bioactive Properties of  $\alpha$  and  $\beta$  Wollastonite Bioceramics Soaked in a Simulated Body Fluid. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **2018**, 9 263-276.
30. Florian, P.; Fayon, F.; Massiot, D.;  $^{29}\text{Si}$  Si-O-Si Scalar Spin-Spin Coupling in the Solid State: Crystalline and Glassy Wollastonite  $\text{CaSiO}_3$ . *J. Phys. Chem. C.* **2009**, 113 2562-2572.
31. Lin, K.; Zhang, M.; Zhai, W.; Qu, H.; Chang, J. Fabrication and Characterization of Hydroxyapatite/Wollastonite Composite Bioceramics with Controllable Properties for Hard Tissue Repair. *J. Am. Ceram. Soc.* **2011**, 94 99-105.
32. Morsy, R.; Abuelkhair, R.; Elnimir, T. A Facile Route to the Synthesis of Hydroxyapatite/Wollastonite Composite Powders by a Two-Step Coprecipitation Method. *Silicon.* **2017**, 9 637-641.
33. Encinas, M.A. Síntesis y Caracterización de Compositos de Hidroxiapatita-Wollastonita, Preparados Mediante la Técnica Sol-Gel. Tesis de Doctorado, Universidad de Sonora, Junio **2009**.

- 
34. Sen, S. Ceramic Whitewares: Their Technologies and Application; Oxford and IBH Publishing co. Pvt. Ltd. New Delhi, India, **1992**.
35. Wang, C.; Lin K.; Chang, J.; Sun, J. Osteogenesis and Angiogenesis Induced by Porous  $\beta$ -CaSiO<sub>3</sub>/PDLGA Composite Scaffold Via Activation of AMPK/ERK1/2 and PI3K/Akt Pathways. *Biomaterials*. **2013**, 34 64–77.
36. Liu, S.; Jin, F.; Lin, K.; Lu, J.; Sun, J.; Chang, J.; Dai, K.; Fan, C. The Effect of Calcium Silicate on *In Vitro* Physicochemical Properties and *In Vivo* Osteogenesis, Degradability and Bioactivity of Porous  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Bioceramics. *Biomed. Mater.* **2013**, 8 025008.
37. Sonntag, R.; Reinders, J.; Kretzer, J.P. What's Next? Alternative Materials for Articulation in Total Joint Replacement, *Acta. Biomater.* **2012**, 8 2434–2441.
38. Sarmiento, C.; Luklinska, Z.B.; Brown, L.; Anseau, M.; Aza, P.N.D.; Aza, S.D. *In Vitro* Behavior of Osteoblastic Cells Cultured in the Presence of Pseudowollastonite Ceramic. *J. Biomed. Mater. Res. A*. **2004**, 69, 351–358.
39. Xu, S.F.; Lin, K.L.; Hu, Y.Y.; Wang, Z.; Chang, J.; Wang, L.; Lu, J.X.; Ning, C.Q. Reconstruction of Calvarial Defect of Rabbits Using Porous Calcium Silicate Bioactive Ceramics. *Biomaterials*. **2008**, 29 2588–2596.
40. Wahab, M.A.; Latif, I.A.; Kohail, M.; Almasry, A. The Use of Wollastonite to Enhance the Mechanical Properties of Mortar Mixes. *Constr. Build. Mater.* **2017** 152 304-309.
41. Lopez, Y.; Flores, K.; Ramirez, M.; Ortiz, L.E. La wollastonita: un Mineral No Metálico, con Múltiples Aplicaciones. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Mineralogía*. **2006**, 17 149-150.

42. Padmanabhan, S.K.; Balakrishnan, A.; Chu, M.C.; Lee, Y.J.; Kim, T.N.; Cho, S.J. Sol-Gel Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanorods. *Particuology*. **2009**, 7 466-470.
43. Encinas, M.A.; Peralta, J.; Valenzuela, J.L.; Castellón, F.F. Synthesis and Structural Characterization of Hydroxyapatite-Wollastonite Biocomposites, Produced by an Alternative Sol-Gel Route. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **2013**, 4 327-333.
44. Jones, J.R.; Clare, A.G. *Bio-Glasses: An Introduction*; Jhon Wiley and Sons, Ltd. West Sussex, United Kingdom. **2012**; pp 29-43.
45. Innocenzi, P. *The Sol-To-Gel Transition*; Springer: Sassari, Italy. **2019**; pp 1-18.
46. Guerra, E.D. *Síntesis y Evaluación de Propiedades Bioactivas de Compositos de Hidroxiapatita-Wollastonita-Quitosa*. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia. Universidad de Sonora, Diciembre **2010**.
47. Almdal, K.; Dyre, J.; Hridt, S.; Kramer, O. Towards a Phenomenological Definition of the Term Gel. *Polym. Gels*: **1993**, 1 5-17.
48. James, P.F. The Gel to Glass Transition: Chemical and Microstructural Evolution. *J. Non-Cryst Solids*: **1988**, 100 93-114.
49. Ogino, M.; Ohnuchi, F.; Hench, L.L. Compositional Dependence of the Formation of Calcium Phosphate Films on Bioglass. *J. Biomed. Mater. Res.* **1980**, 14 55-64.
50. Kokubo, T.; Ohtsuki, C.; Kotani, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T. Surface Structure of Bioactive Glass-Ceramic A-W Implanted into Sheep and Human Vertebra; heimke G, editor. *Bioceramics: Cologne*, German Ceramic Society, **1990**; Vol. 2, pp 113-121.



51. Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T. Solutions Able to Reproduce *In Vivo* Surface-Structure Change in Bioactive Glass-Ceramic A-W. *J. Biomed. Mater. Res.* **1990**, 24 721-734.
52. Kokubo, T.; Ito, S.; Huang, T.; Hayashi, T.; Sakka, S.; Kitsugi, T. Ca, P-rich Layer Formed on High-Strength Bioactive Glass-Ceramic A-W. *J. Biomed. Mater. Res.* **1990**, 24 331-343.
53. Kokubo, T.; Bioactive Glass Ceramics: Properties and Applications. *Biomaterials.* **1991**, 12 155-163.
54. Oyane, A.; Onuma, K.; Ito, A.; Kim, H.M. Kokubo, T.; Nakamura, T. Formation and Growth of Clusters in Conventional and New kinds of Simulated Body Fluids. *J. Biomed. Mater. Res.* **2003**, 64A 339-348.
55. Takadama, H.; Hashimoto, M.; Mizuno, M.; Kokubo, T. Round-Robin Test of SBF for *In Vitro* Measurement of Apatite-Forming Ability of Synthetic Materials. *Phos. Res. Bull.* **2004**, 17 119-125.
56. Ducheyne, P. Bioceramics: Materials Characteristic Versus *In Vivo* Behavior. *J. Biomed. Mater. Res.* **1987**, 21 219-236.
57. Bohner, M.; Lemaître, J. Can Bioactivity Be Tested *In Vitro* with SBF Solution? *Biomaterials.* **2009**, 30 2175-2179.
58. Brash, J.L. Biomaterials in Canada: The First Four Decades. *Biomaterials.* **2005**, 26 7209-7220.
59. Faghi, M.M.; Sharp, M.K. Modeling and Prediction of Flow-Induced Hemolysis: a Review. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **2019**, 18 845-881.

60. Tank, K.P.; Chudasawa, K.S.; Thaker, V.S.; Joshi, M.J. Pure and Zinc Doped Nano-Hydroxyapatite: Synthesis, Characterization, Antimicrobial and Hemolytic Studies. *J. Cryst. Growth.* **2014**, 401 474-479.
61. Guan, R.G.; Johnson, I.; Cui, T.; Zhao, Z.Y.; Li, X; Li, H. Electrodeposition of Hydroxyapatite Coating on Mg-4.0OZn-1.0Ca-0.6Zr Alloy and *In Vitro* Evaluation of Degradation, Hemolysis and Cytotoxicity, *J. Biomed. Mater. Res.* **2012**, 100A 999-1015.
62. Tsamesidis, I.; Kazeli, K.; Lymperaki, E.; Pouroutzidou, G.K.; Oikonomou, I.M.; Komninou, P.; Zachariadis, G.; Reybier, K.; Pantaleo, A.; Kontonasaki, E. Effect of Sintering Temperature of Bioactive Glass Nanoceramics on the Hemolytic Activity and Oxidative Stress Biomarkers in Erythrocytes. *Cel. Mol. Bioeng.* **2020**, 13 201-218.
63. Razzaboni, B.L.; Bolsaitis, P.; Evidence of an Oxidative Mechanism for the Hemolytic Activity of Silica Particles. *Environ. Health. Persp.* **1990**, 87 337-341.
64. Zhang, H., Dunphy, D.R.; Jiang, X.; Meng, H., Sun, B.; Tarn, D.; Xue, M.; Wang, X.; Lin, S.; Ji, Z.; Li, R.; Garcia, F.L.; Yang, J.; Kirk, M.L.; Xia T.; Zink, J.I.; Nel, A.; Brinker, C.J. Processing Pathway Dependence of Amorphous Silica Nanoparticle Toxicity: Colloidal vs Pyrolytic. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 15790-15804.
65. Murashov, V.; Harper, M.; Demchuk, E. Impact of Silanol Surface Density on the Toxicity of Silica Aerosols Measured by Erythrocyte Hemolysis. *J. Occup. Environ. Hygien.* **2006**, 3 718-723.
66. Pavan, C.; Tomatis, M.; Ghiazza, M.; Rabolli, V.; Bolis, V.; Lison, D.; Fubini, B. In Search of the Chemical Basis of the Hemolytic Potential of Silicas. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, 26 1188-1020.

67. Fubini, B.; Surface Reactivity in the Pathogenic Response to Particulates. *Environ. Health Persp.* **1997**, 105 1013-1020.
68. Shi, J.; Hedberg, Y.; Lundin, M.; Wallinder, I.O. Karlsson H.L.; Möller, L. Hemolytic Properties of Synthetic Nanoporous Silica Particles: the Effect of Surface Properties and the Protection by the Plasma Corona. *Acta. Biomater.* **2012**, 8 3478-3490.
69. Sharma, P.; Jain, K.G.; Pandey, P.M.; Mohanty, S. *In Vitro* Degradation Behavior Cytocompatibility and Hemocompatibility of Topologically Ordered Porous Iron Scaffold Prepared Using 3D Printing and Pressureless Microwave Sintering. *Mat. Sci. Eng C-Mater.* **2020**, 106 110247.
70. Fubini, B.; Bolis, V.; Cavenango, A.; Volante, M.; Physicochemical Properties of Crystalline Silica Dust and their Possible Implication in Various Biological Responses. *Scand. J. Work. Environ. Health.* **1995**, 21 9-14.
71. Wiessner, J.; Mandel, G.; Halverson, P.; Mandel, N. The Effect of Hydroxyapatite Crystallinity on Hemolysis. *Calcif. Tissue. Int.* **1988**, 42 210-219.
72. Chen, L.Q.; Fang, L.; Ling, J.; Ding, C.Z.; Kang, B.; Huang, C.Z. Nanotoxicity of Silver Nanotoxicity of Silver Nanoparticles to Red Blood Cells: Size Dependent Adsorption, Uptake, and Hemolytic Activity. *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, 28 501-509.
73. Gerashchenko, B.I.; Gun'ko, V.M.; Gerashchenko, I.I.; Mironyuk, I.F.; Leboda, R.; Hosoya, H. Probing the Silica Surfaces by Red Blood Cells. *Cytom. Part A.* **2002**, 49 56-61.
74. Choi, J.; Reipa, V.; Hitchins, V.M.; Goering, P.L.; Malinauskas, R.A. Physicochemical Characterization and *In Vitro* Hemolysis Evaluation of Silver Nanoparticles. *Toxicol. Sci.* **2011**, 123 133-143.

- 
75. NYCO Minerals Inc. Premium Quality Wollastonite NYAD® M200. NYCO IN-299-04-01 Booklet, NYCO Minerals Inc. Willsboro, NY, **2001**.
76. American Society for Testing and Materials (ASTM) E2524-08. Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles. **2013**.
77. Gómez, A. Manual de Métodos Analíticos para Rocas y Minerales; Universidad de Sonora, México. **2004**; pp 203.
78. Van Loon, J.; Barefoot, R. Analytical Methods for Geochemical Exploration. Academic Press. Toronto, Canadá. **1989**, 344.
79. Jilavenkatesa, A.; Condrate, R.A. Sol-Gel Processing of Hydroxyapatite. J. Mater. Sci. **1998**, 33 4111-4119.
80. Wu, G.; Zhang, X.; Zhang, C.; Xu, T.; Mineralogical and Morphological Properties of Individual Dust Particles in Ice Cores from the Tibetan Plateau. J. Glaciol. **2016**, 62 46-53.
81. Wiessner, J.H.; Mandel, N.S.; Sohnle, P.G.; Mandel, G.S. Effect of Particles Size on Quartz-Induced Hemolysis and on Lung Inflammation and Fibrosis. Exp. Lung. Res. **1989**, 15 801-812.
82. Gerashchenko, B.I.; Gerashchenko, I.I.; Bogomaz, V.I.; Pantazis, C.G. Adsorption of Aerosol on Erythrocyte Surface by Flow Cytometry Measurements. Cytom. **1994**, 15 80-83.
83. Siriphannon, P.; Kameshima, Y.; Yasumori, A.; Okada, K.; Hayashi, S. Formation of Hydroxyapatite on CaSiO<sub>3</sub> Powders in Simulated Body Fluid. J. Euro. Ceram. Soc. **2002**, 22 511-520.

84. Greish, Y.E.; Brown, P.W. Characterization of Wollastonite-Reinforced Hap-Ca Polycarboxylate Composites. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 55 618-628.
85. Xue, W.; Liu, X.; Zheng, X.; Ding, C. Dissolution and Mineralization of Plasma-Sprayed Wollastonite Coatings with Different Crystallinity. *Surface and Coatings Technology.* **2005**, 200 2420-2427.
86. Siriphannon, P.; Kameshima, Y.; Yasumori, A. Okada, K.; Hayashi, S. Influence of Preparation Conditions on the Microstructure and Bioactivity of  $\text{CaSiO}_3$  Ceramics: Formation of Hydroxyapatite in Simulated Body Fluid. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, 52 30-35.
87. Kim, H-Y.; Himeno, T.; Kokubo, T.; Nakamura, T.; Process and Kinetics of Bonelike Apatite Formation on Sintered Hydroxyapatite in Simulated Body Fluid. *Biomaterials.* **2005**, 26 4366-4376.
88. Xin, R.; Leng, Y.; Jiyong, C.; Zhan, Q. A Comparative Study of Calcium Phosphate Formation on Bioceramics *In Vitro* and *In Vivo*. *Biomaterials.* **2005**, 26 6477-6486.
89. Marchesi, V.T.; Furthmayr, H.; Tomita, M.; The Red Cell Membrane, *Ann. Rev. Biochem.* **1976**, 45 667-698.
90. Ada, G.L.; Stone, J.D.; Electrophoretic Studies of Virus-Red Cell Interaction: Mobility Gradient of Cells Treated with Viruses of the Influenza Group and the Receptor-Destroying Enzyme of V. Cholera. *Brit. J. Exptl. Pathol.* **1950**, 31 263-274.
91. Cook, G.M.W.; Heard, D.H.; Seaman, G.V.F.; Sialic Acids and the Electrokinetic Charge of the Human Erythrocyte. *Nature.* **1961**, 191 44-47.

92. Fukuda, M.; Dell, A.; Oates, J.E.; Fukuda, M.N. Structure of Branched Lactosaminoglycan, the Carbohydrate Moiety of Band 3 Isolated from Adult Human Erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **1984**, 259 8260-8273.
93. Depasse, J.; Warlus, J. Relation Between the Toxicity of Silica and its Affinity for Tetraalkylammonium Groups Comparison Between SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>. *J. Colloid. Interf. Sci.* **1976**, 56 618-621.
94. Zhang, E.; Yin, D.; Xu, L.; Yang, L.; Yang, K.; Microstructure, Mechanical and Corrosion Properties and Biocompatibility of Mg-Zn-Mn Alloys for Biomedical Application. *Mat. Sci. Eng. C-Mater.* **2009**, 29 987-993.

