

**CARACTERIZACIÓN DE HIDROXIAPATITAS
SINTÉTICAS NANOESTRUCTURADAS MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (FTIR) Y
DIFRACCIÓN DE RAYOS X (XRD)**

Marco Navatta

Tutor: Dr. Eduardo Méndez

Laboratorio de Biomateriales

Instituto de Química Biológica

Facultad de Ciencias

UdelaR

RESUMEN

En los últimos años se han empleado las hidroxiapatitas (de fórmula general $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) en diversos sectores de la salud, como la implantología y la odontología. Esto se debe a su utilidad en el revestimiento de prótesis, así como en la elaboración de sustitutos óseos, dadas sus características biomiméticas, y sus propiedades de biocompatibilidad, y bioconducción. En el presente trabajo se realizó la síntesis de hidroxiapatitas nanoestructuradas conteniendo diferentes sustituciones: fluoruro, carbonato, estroncio y oxhidrilo. Las mismas se caracterizaron mediante espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) con el objetivo de confeccionar una biblioteca espectral que permita identificar las apatitas biológicas, de las cuales se ensayaron dos en este trabajo: una muestra de esmalte dental y otra de calcificación ósea del tendón del hombro. Para ello se implementó un protocolo de espectroscopia derivada combinada con una deconvolución gráfica para analizar los espectros FT-IR, de modo de identificar, en función de las bandas del fosfato y fosfato ácido, sus respectivos ambientes químicos, y así reconocer la presencia de moléculas en un entorno apatítico y/o no-apatítico. Sumado a esto se identificaron otras bandas del espectro, como son las bandas del agua constitutiva y del carbonato, las cuales permitieron tener una mejor comprensión de la composición de las apatitas biológicas ensayadas. A su vez se complementó el análisis a través de la técnica FT-IR mediante el cálculo de tres índices de cristalinidad: el *splitting factor*, y las relaciones $1030/1020 \text{ cm}^{-1}$ y $1060/1075 \text{ cm}^{-1}$, los cuales se calcularon tanto para las hidroxiapatitas sintetizadas como para las apatitas biológicas. A modo de obtener información adicional se emplearon otras técnicas. Por un lado la espectroscopia de difracción de rayos X (XRD) permitió, junto con el FTIR, la correcta identificación de las hidroxiapatitas sintetizadas, así como la obtención de los tamaños de cristalitas. Por otro lado, la observación mediante microscopía electrónica de barrido permitió obtener información sobre la topografía de las muestras, y la espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) fue utilizada con el fin de conocer la relación Ca/P de las apatitas tanto sintéticas como biológicas. Todos los ensayos realizados, a excepción del XRD, fueron repetidos para las apatitas sintetizadas luego de ser tratadas térmicamente de manera de conocer el efecto de tal tratamiento sobre la cristalinidad de las mismas. Por último se realizó una síntesis espontánea de hidroxiapatita sobre placa de titanio sumergida en un medio simul de fluido biológico (*simulated body fluid*, SBF), la que se identificó empleando la biblioteca espectral de FT-IR desarrollada en este trabajo.

Palabras Clave: Hidroxiapatita, Carboxiapatita, Estroncioapatita, Fluorhidroxiapatita, apatita nanoestructurada, apatita biológica, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a los entes responsables del financiamiento de este trabajo: la Comisión Sectorial de Investigación Científica de la Universidad de la República, a través del proyecto CSIC-PAIE 2010 (Responsables M. Navatta y M. Söhnora) y la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por el Proyecto FONDO CLEMENTE ESTABLE #220 (Responsable E. Méndez), y PEDECIBA QUIMICA. En segundo lugar a quienes me permitieron presentar los resultados de este trabajo, por un lado el Segundo Encuentro Nacional de Ciencias Químicas, ENAQUI 2011, en el cual se presentó en formato poster, el seminario del IQB 2013, en donde realicé la exposición oral del trabajo, y el 1er Congreso Internacional de Nanotecnología y Biomateriales en 2010, en el cual mi tutor el Dr. Eduardo Méndez presentó por exposición oral parte de los resultados.

A su vez debo un agradecimiento muy especial al Dr. Enrique Dalchiele (Laboratorio de Física del Estado Sólido, Instituto de Física, Facultad de Ingeniería) quien realizó los XRD de las muestras sintetizadas, resultado importante de este trabajo. También al Lic. Pablo Tancredi (Lab. Biomateriales de la Facultad de Ciencias y Laboratorio de Sólidos Amorfos de la Universidad de Buenos Aires), quienes brindaron algunos patrones XRD de compuestos fosfocálcicos, y facilitaron la obtención de una base de datos de los mismos. Al M.Sc. Marcel Bentancour del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, a todos los integrantes del Laboratorio de Biomateriales, particularmente a Santiago Botasini, quien siempre estuvo dispuesto a brindar una mano cuando lo necesitase, y muy especialmente al Dr. Eduardo Méndez, por confiar en mí para la realización de este trabajo y por sus innumerables consejos. No quiero dejar de agradecer a mis compañeros de la Cátedra de Inmunología, especialmente a Gustavo Mourglia y Sylvia Dematteis que me han brindado su apoyo y el tiempo que necesité para escribir este trabajo, así como a mi familia y amigos por todo su apoyo.

ÍNDICE ALFABÉTICO DE ABREVIATURAS

- AB - Apatitas biológicas
 - ACP (fosfato de calcio amorfo)
 - CA (Carboxiapatita)
 - CFC (Cementos de Fosfato de Calcio)
 - CHA (Cementos de Hidroxiapatitas)
 - EDS (Espectrómetro de dispersión de energía de rayos X)
 - EDTA (etilendiaminotetraacético)
 - FA (Fluorapatita)
 - FA 550 (Fluorapatita tratada durante 1h a 550 °C)
 - FTIR (Espectroscopia infrarroja por la transformada de Fourier)
 - HA (Hidroxiapatita)
 - HAc (Hidroxiapatita comercial Bio-Gel HTP)
 - HAc 550 (Hidroxiapatita comercial Bio-Gel HTP tratada durante 1h a 550 °C)
 - HAs (Hidroxiapatita sintética)
 - HAs 550 (Hidroxiapatita tratada durante 1h a 550 °C)
 - MCP (monocalciofosfato)
 - OCP (octacalciofosfato)
 - SEM (Microscopio electrónico de barrido)
 - SrA (Estroncioapatita)
 - SrA 550 (Estroncioapatita tratada durante 1h a 550 °C)
 - TCP (tricalciofosfato)
 - TTCP (tetracalciofosfato)
 - XRD (Difracción de rayos X)
-
- λ (Longitud de onda)
 - Θ (Ángulo de incidencia de la técnica XRD)

CONTENIDO

RESUMEN	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE ALFABÉTICO DE ABREVIATURAS	iii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Importancia de las apatitas: Características, propiedades y relación con las estructuras biológicas.	1
1.1.1 Apatitas Biológicas.....	1
1.1.2 Principales tipos de apatitas	2
1.1.2.1 Hidroxiapatita	2
1.1.2.2 Carboxiapatita	2
1.1.2.3 Fluoroapatita	3
1.1.3 Tejidos mineralizados en humanos.....	3
1.1.3.1 Estructura y propiedades del diente.....	3
1.1.3.2 Estructura y propiedades del hueso.	4
1.1.3.3 Propiedades fisicoquímicas del ambiente no-apatítico.	5
1.1.3.4 Maduración.	6
1.1.3.5 Funciones biológicas de las apatitas óseas	9
1.2 Desarrollo de implantes ortopédicos	10
1.2.1 Características de los implantes óseos y buco-maxilofaciales.	10
1.2.2 Efectos del uso de hidroxiapatitas como revestimiento de implantes metálicos.	11
1.2.3 Efectos de la nanoestructuración de implantes.....	13
1.3 Síntesis de Hidroxiapatitas Nanoestructuradas	14
1.3.1 Precipitación en solución acuosa	15
1.3.2 Intermediarios en la síntesis acuosa de hidroxiapatitas	16
1.4 Caracterización de hidroxiapatitas	17
1.4.1 Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS).	18
1.4.2 Técnica de Difracción de rayos X (XRD)	18
1.4.2.1 Bases de la técnica XRD	18
1.4.2.2 Métodos de difracción de rayos X.	19
1.4.2.3 Aplicaciones de la difracción de rayos X	21
1.4.3 Espectroscopia de absorción infrarroja	22
1.4.3.1 Aspectos generales	22

1.4.3.2	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	24
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1	Materiales.....	29
3.1.1	Reactivos y soluciones.....	29
3.1.2	Equipos.....	29
3.2	Métodos.....	29
3.2.1	Síntesis de hidroxiapatitas nanoestructuradas.....	29
3.2.2	Síntesis de carboxiapatita tipo-B nanoestructurada.....	30
3.2.3	Síntesis de fluorhidroxiapatita.....	30
3.2.4	Síntesis de estroncioapatita.....	30
3.2.5	Muestras de apatitas biológicas.....	31
3.2.6	Preparación de apatitas sintéticas mufleadas.....	31
3.2.7	Cálculo de los tamaños de cristalita en función del XRD.....	31
3.2.8	Preparación de las muestras para su caracterización por FTIR.....	31
3.2.9	Procedimiento de deconvolución gráfica de los espectros FTIR.....	31
3.2.10	Cálculo de los índices de cristalinidad.....	32
3.2.11	Obtención de imágenes por el microscopio electrónico de barrido (SEM).....	32
3.2.12	Obtención de la relación Ca/P por dispersión de rayos X (EDS).....	32
3.2.13	Preparación de fluido biológico simulado (SBF).....	32
3.2.14	Deposición de hidroxiapatita en placas de titanio sumergidas en SBF.....	34
4	RESULTADOS.....	35
4.1	Caracterización de apatitas sintéticas mediante XRD.....	35
4.2	Caracterización de las apatitas sintéticas mediante FTIR.....	36
4.2.1	Análisis de los patrones FTIR.....	36
4.2.2	Análisis por deconvolución gráfica de espectros FTIR.....	39
4.2.3	Cálculo de los índices de cristalinidad.....	43
4.3	Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido acoplada a un Espectrómetro de Dispersión de rayos X (SEM-EDS).....	43
4.4	Síntesis de apatitas sobre placas de titanio.....	46
5	DISCUSIÓN.....	47
6	CONCLUSIONES.....	54
7	BIBLIOGRAFÍA.....	54

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de las apatitas: Características, propiedades y relación con las estructuras biológicas.

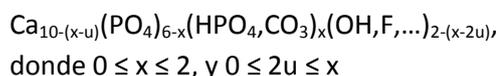
1.1.1 Apatitas Biológicas

En la naturaleza existe una vasta variedad de compuestos fosfo-cálcicos, de origen tanto geológico como biológico (Cazalbou *et al.* 2004a; Rey *et al.* 2009). A lo largo de la evolución los organismos biológicos han adquirido la capacidad de utilizar los cristales de fosfato de calcio formando diversas estructuras, como gránulos o tejidos, permitiéndoles cumplir varias funciones vitales. Los microorganismos unicelulares utilizan los minerales fosfo-cálcicos para regular su concentración iónica interna, ya sea acumulando iones (función de reserva), o liberándolos al medio (excreción) (Cazalbou *et al.* 2004a). Otros organismos, como los corales, utilizan los depósitos minerales externos para protegerse. A su vez, los vertebrados poseen tejidos mineralizados (huesos, dientes) los cuales, además de conservar evolutivamente las funciones de reserva y regulación iónica, poseen funciones estructurales y permiten la movilidad (Cazalbou *et al.* 2004a).

En 1926 se identificó por primera vez la estructura de los compuestos minerales presentes en los vertebrados, mediante el uso de la técnica de difracción de rayos X. Ésta sugirió que tales compuestos forman parte de la familia de las apatitas, en particular se las identificó como hidroxapatitas (HAs) (Eichert *et al.* 2009; Rey *et al.* 2009). Sin embargo, actualmente se sabe que no son hidroxapatitas puras

sino que poseen algunos otros iones en su estructura como CO_3^{2-} y HPO_4^{2-} , además de presentar una muy baja cristalinidad, y un tamaño promedio de sus cristalitas en el entorno de los nanómetros (Kokubo 2008; Eichert *et al.* 2009; Rey *et al.* 2009; Farlay *et al.* 2010). Tales cristalitas constituyen la unidad que componen los polvos, y se presentan orientados azarosamente en el espacio (Xian 2009).

Estas apatitas que constituyen la fase inorgánica o mineral de los tejidos mineralizados de los vertebrados, se las conoce con el nombre de apatitas biológicas (AB). Las apatitas son compuestos de fórmula general $\text{Me}_{10}(\text{XO}_4)_6\text{Y}_2$, donde Me es un ión divalente, XO_4 es un ión trivalente, e Y es un ión monovalente. Sin embargo para el caso de las apatitas biológicas no es tan fácil definir una fórmula general, debido a una propiedad sumamente interesante que presentan, y que es su gran capacidad para aceptar y acomodar una amplia variedad de sustituciones iónicas y vacantes dentro de su estructura (Mathew and Takagi 2001; Cazalbou *et al.* 2005). Por tanto a lo largo de los años varios autores han propuesto diferentes aproximaciones a modo de fórmula general, de las cuales una de las más recientes es (Grossin *et al.* 2010):



Los organismos vivos aprovechan esta propiedad para mantener su homeostasis, al adaptar sus tejidos mineralizados en función de sus necesidades fisiológicas y funcionales. Es por esta razón que las AB rara vez se observan como apatitas estequiométricas; por el contrario, como ya se mencionó, presentan pequeñas cantidades de una gran variedad de iones sustituyentes (Mathew and Takagi 2001; Cazalbou *et al.* 2005). Esta característica tan importante es debida al

tamaño nanométrico de sus cristales y a las propiedades de su superficie, lo cual se comentará en las secciones siguientes. Sumado a esto, las apatitas son las estructuras más estables dentro de los compuestos fosfo-cálcicos. En resumen todas estas características únicas le han permitido a las apatitas formar parte de los tejidos mineralizados cumpliendo desde funciones mecánicas tales como permitir la movilidad o proteger los tejidos blandos, hasta funciones metabólicas, como la regulación de la homeostasis iónica de los fluidos biológicos del organismo.

1.1.2 Principales tipos de apatitas

1.1.2.1 Hidroxiapatita

La hidroxiapatita es una de las apatitas más estudiadas debido a su gran similitud con las apatitas biológicas presentes en los huesos y los dientes de los seres humanos (Trommer *et al.* 2009). Su fórmula química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, con una relación calcio/fósforo (Ca/P) de 1.67 (Cazalbou *et al.* 2004b; Trommer *et al.* 2009; Xian 2009). Presentan comúnmente una estructura de cristal hexagonal de grupo espacial cristalográfico $P6_3/m$, con los parámetros de celda $a=b= 9.432$ y $c=6.881$. En el caso de las hidroxiapatitas estequiométricas sintéticas, el sistema cristalino es monoclinico y su grupo espacial cristalográfico es $P2_1/b$, con los parámetros de celda $a= 9.4214$, $b= 2a$, y $c=6.8814$ (Mathew and Takagi 2001).

Esta estructura puede soportar diversas sustituciones parciales o totales, ya sea del catión Ca^{2+} como de los aniones PO_4^{3-} u OH^- , con una distorsión mínima o nula. Las sustituciones siempre son del tipo catión por catión y anión por anión, aunque el módulo de la carga no tiene porque ser siempre

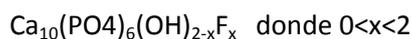
igual. En los casos en que se produce un desbalance de carga se generan vacantes en el cristal. Por ejemplo la sustitución de PO_4^{3-} por HPO_4^{2-} provoca la liberación de un Ca^{2+} y un OH^- dejando dos vacantes (Cazalbou *et al.* 2004a). Tales sustituciones puede variar el valor de la relación Ca/P en función de la naturaleza de las mismas y del tiempo que se mantenga en solución, ya sea en fluidos biológicos o aguas madre, debido a un proceso conocido como maduración (Cazalbou *et al.* 2004b), y en el que ahondaremos más adelante. Las diversas sustituciones iónicas que se dan en las apatitas óseas puede producir variaciones en la relación Ca/P en un rango entre 1.37 y 1.87 (Xian 2009). Tanto la hidroxiapatita como sus variantes sustituidas presentan una estabilidad térmica importante, capaces de soportar sin degradarse temperaturas por encima de los 1000 °C. También son químicamente estables e insolubles en medios neutros o básicos, pero son solubles en medio ácido. Esta es la razón por la cual las hidroxiapatitas que forman los dientes se debilitan con el medio ácido provocado por bacterias generadoras de caries (Xian 2009).

1.1.2.2 Carboxiapatita

La carboxiapatita es una hidroxiapatita que presenta carbonato como sustituyente del hidroxilo (carboxiapatitas de tipo A) o del fosfato (carboxiapatitas de tipo B). Son las apatitas más ampliamente utilizadas por los organismos para formar sus estructuras biológicas mineralizadas. Las apatitas biológicas son principalmente carboxiapatitas de tipo B y en menor proporción de tipo A (Mathew and Takagi 2001).

1.1.2.3 Fluoroapatita

La fluoroapatita es la apatita más insoluble, y con la mayor estabilidad térmica y química (Xian 2009). Estas propiedades la hacen muy adecuada para formar parte del tejido mineralizado de los dientes (Cazalbou *et al.* 2004a). Además el flúor es capaz de estimular la remineralización del esmalte dental y la proliferación de células formadoras de hueso, por lo que es común el uso de flúor en pastas dentales para mejorar la resistencia de los dientes a las caries (Cazalbou *et al.* 2004a). La fórmula química de la fluorapatita es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, por lo que es una hidroxiapatita que posee flúor como sustituyente del hidroxilo (Manjubala *et al.* 2001). Presenta una estructura cristalográfica hexagonal, un grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$ y parámetros de celda $a=b= 9.367$ y $c= 6.884$ (Mathew and Takagi 2001). La fluoroapatita se la puede encontrar formando una solución sólida con la hidroxiapatita, comúnmente denominado fluorhidroxiapatita, de fórmula:



Este compuesto se obtiene por precipitación en medio acuoso más fácilmente que la fluorapatita, incluso en presencia de altas concentraciones de flúor (León and Jansen 2009).

1.1.3 Tejidos mineralizados en humanos

Los huesos y dientes son tejidos altamente complejos y mineralizados formados por compuestos fosfo-cálcicos. Esta particularidad les permite cumplir sus funciones fisiológicas vitales, como son en el caso del diente las funciones principalmente mecánicas y estéticas, como la masticación, la fonética o la expresión facial; y en el caso de los huesos las funciones tanto mecánicas, estructurales, de soporte corporal,

movilidad, así como funciones metabólicas, como es la regulación de la concentración iónica de fluidos biológicos (Rey *et al.* 2009; Bueno and Glowacki 2011).

1.1.3.1 Estructura y propiedades del diente.

El diente está constituido por cuatro tejidos: esmalte, cemento, dentina y pulpa (Figura 1.1). Esta última se la conoce como tejido blando y presenta vascularización e inervaciones, mientras que los tres primeros se los conoce como tejidos duros debido a que se encuentran mineralizados (Nelson and Major M. Ash 2010). El esmalte es el componente que presenta mayor grado de mineralización (97% del peso) y está compuesto principalmente por una hidroxiapatita semejante a la estequiométrica, con un contenido del 2-4% de carbonato (Penel *et al.* 1998). El poseer apatitas casi estequiométricas, compuestas por cristales largos y de baja área superficial específica, le proporciona una baja solubilidad. Esto le brinda al diente cierta resistencia al ataque ácido de las comidas y bacterias de la flora comensal bucal (Cazalbou *et al.* 2004a). Otra característica es la orientación estricta de los cristales,

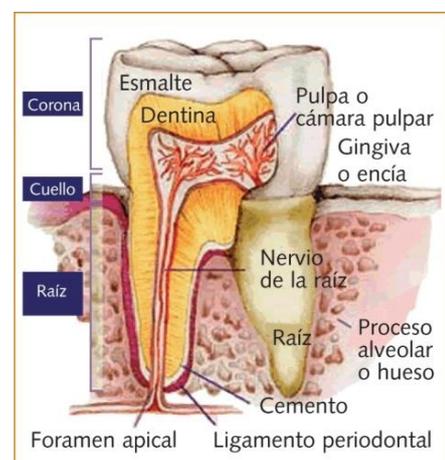


Figura 1.1. Anatomía del diente. Fuente: <http://www.elsevierciencia.com/es/revista/farmacologia-profesional-3/articulo/cuidado-las-encias-13116004>

alineados todos de forma perpendicular a la superficie del esmalte, correspondiente a la dirección de crecimiento del cristal, lo que le confiere una alta tasa de crecimiento y la posibilidad de remineralizarse parcialmente por acción de la saliva (Cazalbou *et al.* 2004a). El esmalte se encuentra cubriendo la dentina a la altura de la corona anatómica brindándole protección (Figura 1.1). Esta misma función cumple el cemento, un tejido muy similar al óseo, que rodea la dentina a la altura de la raíz anatómica. Por último la dentina es el tejido más abundante del diente, se encuentra formando el núcleo del mismo rodeando la pulpa (Fuller *et al.* 2001). El conjunto de estos tejidos duros le brindan al diente una baja solubilidad, resistencia al ataque de ácidos, y la resistencia mecánica necesaria para cumplir con su principal función: la masticación.

1.1.3.2 Estructura y propiedades del hueso.

El hueso se compone de tejido óseo, un tejido conjuntivo mineralizado formado por laminillas, que a su vez se componen de células y fibras de colágeno (Figura 1.2). Según la disposición de las laminillas en la estructura del hueso, se los clasifica en huesos corticales o esponjosos. Ambos presentan células especializadas, una matriz extracelular orgánica (30 % del peso), y una fase mineral (70 % del peso) (Cazalbou *et al.* 2004a; Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil *et al.* 2006; Bueno and Glowacki 2011). La matriz orgánica se compone principalmente de fibras de colágeno (90%), dentro de los cuales el 95-98% es colágeno de tipo I, y el resto colágeno de tipo V y en muy pequeñas cantidades colágeno de tipo III y XII (Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil *et al.* 2006; Kokubo 2008; Bueno and Glowacki 2011). Además presenta otras proteínas, como las glicoproteínas, proteoglicanos,

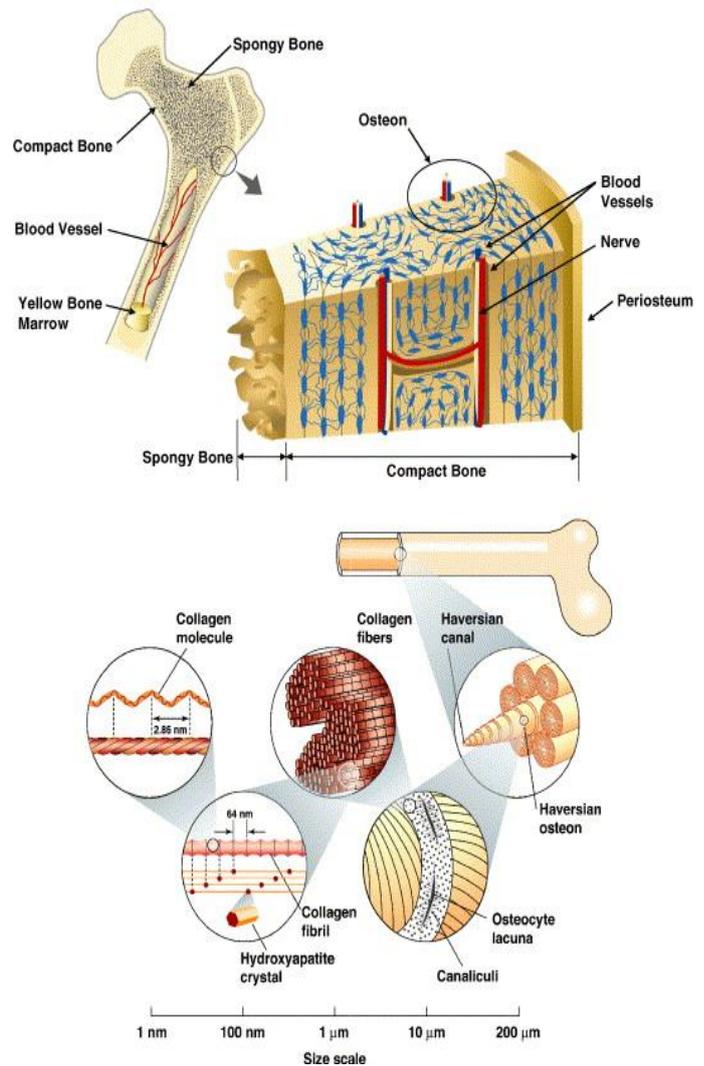


Figura 1.2. Estructura jerárquica del hueso cortical. Adaptado de Ref. (Nalla *et al.* 2006).

proteínas del plasma y factores de crecimiento (Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil *et al.* 2006; Kokubo 2008; Bueno and Glowacki 2011). Esto le confiere al hueso funciones estructurales, elasticidad, y funciones relacionadas al mantenimiento de la integridad del tejido óseo, al actuar como reservorio de las proteínas necesarias para el desarrollo celular (Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil *et al.* 2006; Bueno and Glowacki 2011). Por otra parte, la fase inorgánica está compuesta por apatitas pobremente cristalizadas, específicamente por hidroxiapatitas deficientes en calcio y fósforo, debido a sustituciones por los aniones carbonato y fósforo ácido, y en

menor medida sodio, magnesio, manganeso, flúor, pirofosfato, cloruro, estroncio, cobre, zinc o hierro (Cazalbou *et al.* 2004b; Kokubo 2008; Seo and Lee 2008; Farlay *et al.* 2010; Bueno and Glowacki 2011). Los aniones como el cloruro o el flúor sustituyen a los hidroxilos, otros aniones como el carbonato sustituyen tanto hidroxilos como fosfatos, y por último los cationes metálicos sustituyen al calcio (Seo and Lee 2008). Los cristales de estas apatitas presentan forma de placas delgadas de dimensiones nanométricas, que varían en el entorno de 5 nm a 40 nm de ancho y de unos 50 nm de largo (Kokubo 2008). El tamaño de cristal característico les proporciona una enorme área superficial, y por ende una alta reactividad (Bueno and Glowacki 2011).

Además la superficie de estos cristales exhibe una “capa hidratada” que se origina en contacto con el fluido extracelular (Figura 1.3). (Cazalbou *et al.* 2005; Farlay *et al.* 2010). Esto le confiere una reactividad aún mayor a la superficie del hueso, ya que la estructura de esta capa está compuesta por iones muy lábiles y reactivos. Estos iones constituyen el *dominio no-apatítico* del cristal óseo, que rodea a un núcleo relativamente inerte, más estable y rígido, conocido como *dominio apatítico* (Farlay *et al.* 2010). Los iones lábiles presentes en la capa hidratada pueden intercambiarse con los iones del medio o con proteínas cargadas, o pueden pasar a formar parte del dominio apatítico. Por esta razón este último no es estequiométrico, sino que presenta sustituciones y vacantes (Farlay *et al.* 2010). La presencia de estos ambientes no apatíticos tan reactivos en la superficie le proporciona a los cristales óseos un conjunto de propiedades fisicoquímicas indispensables para cumplir con sus funciones biológicas. Tal es su importancia que el hueso está en constante renovación

para mantener las propiedades de sus cristales en las mejores condiciones posibles.

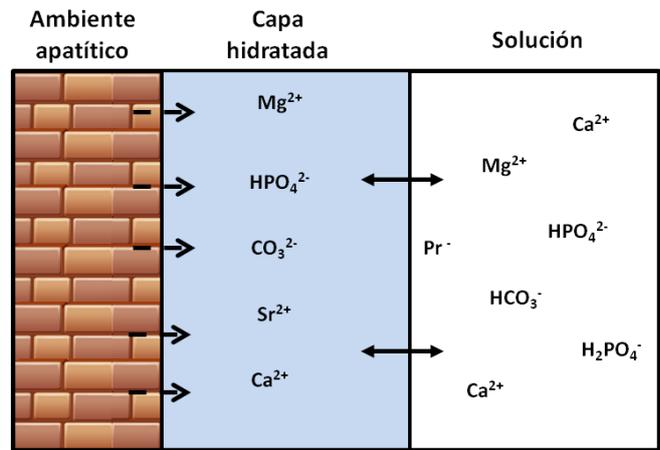


Figura 1.3. Esquemización de la estructura de la capa hidratada. Se puede observar a la izquierda la capa apatítica (representada como ladrillos), en el medio la estructura de capa hidratada o estructura no apatítica que corresponde a la superficie del cristal (representada en celeste), y a la derecha el fluido extracelular. Mediante flechas dobles está representada la capacidad de intercambiar fácilmente iones y proteínas entre la capa hidratada y la solución, dado que los iones de la primera son lábiles. Algunos de los iones pueden ser incorporados desde la capa hidratada al ambiente apatítico durante el crecimiento de este último (representado con flechas punteadas).

1.1.3.3 Propiedades fisicoquímicas del ambiente no-apatítico.

En virtud de las dimensiones nanométricas de sus cristalitas, las apatitas biológicas que forman parte del hueso presentan una elevada relación superficie/volumen. A su vez, varias de las funciones del hueso están relacionadas con la superficie de los cristales que la componen y su interacción con los fluidos biológicos (Eichert *et al.* 2009). Todo esto hace muy atractivo el estudio de la superficie de estos nanocristales.

Diversos análisis espectroscópicos (como FTIR o ³²P-NMR) han confirmado la existencia de los dos ambientes iónicos en el cristal: apatítico y no-apatítico. El ambiente apatítico corresponde a una capa hidratada presente en la superficie del cristal (Cazalbou *et al.* 2004b; Cazalbou *et al.* 2005; Rey *et al.* 2009).

La capa hidratada se forma en solución acuosa, pudiendo considerársela como la transición progresiva entre el estado sólido y líquido (Eichert *et al.* 2002). Se cree que en medio acuoso es capaz de inducir o facilitar el crecimiento del cristal. Además algunos autores sugieren que la presencia de esta capa disminuye la energía superficial del mismo (Eichert *et al.* 2002; Cazalbou *et al.* 2005; Eichert *et al.* 2009). Presenta una estructura desordenada formada por iones lábiles, de relativa alta movilidad, situados en sitios no-apatíticos. Algunos de los más comunes son el carbonato y fosfato ácido, que son fácilmente intercambiables entre sí y por iones del medio, lo cual sugiere que comparten su sitio en la capa hidratada. Se puede ver este comportamiento al sumergir nanocristales de apatitas en soluciones de alta concentración de carbonato o de fosfato ácido. Si se lo sumerge en la primera, aumenta la concentración de carbonato en el cristal y disminuye la concentración de fosfato ácido; posteriormente al sumergirlo en la segunda solución se observa exactamente el fenómeno opuesto (Cazalbou *et al.* 2004b; Eichert *et al.* 2009). Esta capacidad de intercambiar los iones de forma altamente reversible es debido a la gran accesibilidad de los sitios de unión de la superficie y a la alta movilidad de los iones que la componen. Es importante destacar que esto ocurre solo en la capa hidratada, ya que el carbonato presente en el ambiente apatítico permanece inalterado al sumergir el cristal en una solución rica en fosfato (Eichert *et al.* 2009). Esto último se debe a que en el ambiente apatítico los iones están más fuertemente unidos que en la capa hidratada (Cazalbou *et al.* 2004b).

La capa hidratada además es capaz de aceptar e incorporar iones traza, como el Sr^{2+} , Mg^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} , F^- , entre otros, según sea la composición del medio (Cazalbou *et*

al. 2004b). Así, una vez que los iones son incorporados y localizados en la capa son plausibles de ser liberados nuevamente al medio. Este proceso de liberación es más rápido que la captación, y a la vez incompleto ya que no se pueden liberar la totalidad de los iones que han sido incorporados (Cazalbou *et al.* 2005). Dependiendo de la naturaleza del ion puede variar el grado de intercambio entre la capa y el medio. Por ejemplo, a igual concentración en el medio, la tasa de intercambio del Sr^{2+} es más elevada que la del Mg^{2+} (Cazalbou *et al.* 2005). Otra particularidad que presenta la capa hidratada es que puede incluso adsorber o liberar proteínas, así como también intercambiar grupos de proteínas cargadas por iones, como la albumina, factores de crecimiento, proteínas colagénicas, etc. (Cazalbou *et al.* 2004b).

La capacidad de intercambiar iones y de adsorber proteínas varía con el paso del tiempo. El envejecimiento del hueso provoca la disminución gradual de la capacidad de captación y liberación de iones por parte de la capa hidratada, así como también una disminución gradual en la capacidad de adsorber proteínas. Esto ocurre durante un proceso conocido como *maduración* (Eichert *et al.* 2002; Cazalbou *et al.* 2004b; Farlay *et al.* 2010).

1.1.3.4 Maduración.

Las apatitas no estequiométricas son termodinámicamente inestables, por lo que en solución, se van transformando gradualmente en estequiométricas con el paso del tiempo (Eichert *et al.* 2009). El envejecimiento del cristal conlleva una gradual ampliación del ambiente apatítico en sustitución del ambiente no-apatítico con la consecuente disminución de la capa

hidratada y por ende, de todas las propiedades que ésta le confiere al cristal (Eichert *et al.* 2009; Farlay *et al.* 2010). A este proceso por el cual las apatitas no estequiométricas pierden su ambiente no-apatítico se le conoce como *maduración* o *envejecimiento* en solución (Eichert *et al.* 2009). Es importante diferenciarlo de otros tipos de maduración como el proceso de maduración de Ostwald, el cual corresponde a la disminución de la energía superficial del sólido, mediante la disolución de los cristales más pequeños, incrementando aun más el tamaño de los cristales más grandes. Este fenómeno a diferencia de la maduración en solución es muy lento, al punto que no es apreciable en una escala de tiempo biológica, siendo observable por ejemplo en los restos fósiles (Cazalbou *et al.* 2004a).

La maduración del cristal es un proceso fisicoquímico, termodinámicamente favorable, que ocurre a lo largo del tiempo en un medio acuoso, ya sea el medio extracelular para el caso de los cristales del hueso, como las aguas madres para las apatitas sintéticas (Eichert *et al.* 2002; Eichert *et al.* 2009). Aún no está elucidado el mecanismo por el cual ocurre este fenómeno, pero sí se han estudiado los cambios estructurales que genera en el cristal y sus efectos (Eichert *et al.* 2002; Eichert *et al.* 2009).

El cristal no estequiométrico inicialmente presenta un extendido ambiente no-apatítico, el cual durante la maduración va perdiéndose, dando lugar a un ambiente apatítico creciente (Eichert *et al.* 2009). Se ha observado durante el proceso de maduración una exclusión de las moléculas de agua así como una disminución de las moléculas de HPO_4^{2-} . Simultáneamente la concentración de Ca^{2+} , OH^- y CO_3^{2-} aumentan en el ambiente apatítico (Eichert *et al.* 2002).

Particularmente el CO_3^{2-} entrante sustituye al HPO_4^{2-} (Eichert *et al.* 2009).

El ambiente apatítico presenta interacciones más estables entre moléculas que la capa hidratada, y por ende durante la maduración aumenta la rigidez y estabilidad estructural del cristal (Eichert *et al.* 2002). Al ambiente apatítico se pueden incorporar irreversiblemente las sustituciones iónicas ya presentes en la capa hidratada, los cuales a medida que progresa la maduración, al ir uniéndose en una matriz más rígida, permanecen cada vez menos disponibles para su liberación al medio (Cazalbou *et al.* 2005; Eichert *et al.* 2009). Este tipo de comportamiento lo presentan los iones capaces de sustituir con facilidad alguno de los iones del ambiente apatítico (Ca^{2+} , PO_4^{3-} o OH^-). Por otro lado, los iones incapaces de entrar al ambiente apatítico o con dificultades para hacerlo pueden retrasar el proceso de maduración, al permanecer en la capa hidratada (Cazalbou *et al.* 2005). Un ejemplo de esto lo constituye el Mg^{2+} , el cual a medida que la maduración avanza, sigue siendo igualmente capaz de intercambiarse entre la capa y el medio, dado que se mantiene preferiblemente en la capa hidratada y no es incorporado al ambiente apatítico por su dificultad para sustituir al calcio allí presente, generando un retraso en el crecimiento del ambiente apatítico. El Sr^{2+} es un ejemplo del caso contrario, ya que se ha observado que puede ser incorporado al ambiente apatítico dado que a medida que avanza la maduración el mismo va quedando cada vez más retenido en el cristal y menos disponible para intercambiar con el medio (Cazalbou *et al.* 2005). Algunos iones, como es el CO_3^{2-} , presentan un comportamiento intermedio entre estas dos categorías. Si bien este anión es capaz de entrar al ambiente apatítico, es conocida su gran capacidad inhibitoria del crecimiento del

cristal (Eichert *et al.* 2009), por lo que dependiendo del estado de maduración del cristal, parte de él puede permanecer estabilizando la capa hidratada enlenteciendo así el proceso de maduración (Cazalbou *et al.* 2005).

En el hueso normal el avance del proceso de maduración va acompañado con el cambio de otros parámetros fisicoquímicos, como es el aumento del *índice de cristalinidad* (Eichert *et al.* 2009). Este último es una medida del grado de ordenamiento en un sólido, y su incremento puede deberse tanto al aumento del tamaño de los cristales en promedio, como a la disminución en las sustituciones y vacantes, volviéndose los cristales más estequiométricos, ordenados o “perfectos”. Durante la maduración el ambiente apatítico incrementa su tamaño y el cristal se torna más organizado, lo que se refleja en un aumento del índice de cristalinidad. Por el contrario el hueso joven o inmaduro presenta una baja cristalinidad, debido a que posee una importante capa hidratada y un ambiente apatítico menor (Farlay *et al.* 2010). Dada esta relación se ha utilizado en numerosos casos al índice de cristalinidad como parámetro para evidenciar el estado de maduración, sin embargo algunos autores cuestionan que tal relación efectivamente pueda establecerse (Kuhn *et al.* 2008; Farlay *et al.* 2010).

La presencia de una capa hidratada bien desarrollada en los cristales óseos es una necesidad biológica. Debido a la pérdida continua de esta capa con el tiempo, el organismo invierte mucha energía en la renovación y remodelación del hueso. Sin embargo, el envejecimiento del organismo conlleva a la disminución de la capacidad de renovación del hueso (Kuhn *et al.* 2008; Eichert *et al.* 2009). Al mismo se lo considera maduro cuando su capacidad de renovación disminuye al punto que es notorio el efecto

de la maduración de los cristales que lo componen.

Los efectos de la maduración se manifiestan claramente en la capacidad que tiene el hueso de absorber metales contaminantes. Los niños o jóvenes son muy sensibles a la contaminación con dichos iones metálicos, ya que sus huesos inmaduros presentan una gran proporción de ambientes no apatíticos capaces de intercambiar iones con el medio, lo cual conlleva a la bioacumulación del metal, y posterior liberación en sangre mediante la resorción ósea. (Eichert *et al.* 2009). Por ejemplo, la contaminación por plomo produce su mayor daño por su presencia en sangre; sin embargo su bioacumulación en los huesos puede generar daños en este órgano, siendo posible además la liberación del plomo a la sangre generando así un aumento de la plumbemia incluso después de retirar la exposición exógena al plomo. Por tanto la acumulación de metales pesados en el tejido óseo se puede ver como una fuente endógena de estos contaminantes (Sanín *et al.* 1998).

Otro ejemplo interesante de relación entre la capacidad de renovación y la acumulación de iones esta dado por la deposición de estroncio en huesos con cáncer, que duplica la que se verifica en huesos sanos. Esto se debe a que el hueso con cáncer tiene una mayor tasa de renovación (Cazalbou *et al.* 2005).

Es interesante que pese a la inestabilidad de la capa hidratada, a lo largo de la evolución los organismos siguen utilizándola e invierten mucha energía en su mantenimiento, lo cual da una idea de la importancia que tiene a nivel biológico.

1.1.3.5 Funciones biológicas de las apatitas óseas

Las propiedades de las apatitas biológicas dependen de varios parámetros, como la composición, el tamaño del cristal, la morfología, la relación ambiente apatítico/no-apatítico, y en gran medida a su extensa área superficial y su capa hidratada. Estos últimos le permiten cumplir con su principal función biológica, la regulación de la homeostasis iónica, al actuar como reservorio de iones gracias a su capacidad para incorporar o liberar los mismos al medio extracelular en función de las necesidades del organismo. Como ya se mencionó, esta capacidad de mantener la homeostasis va a depender del estado de maduración del cristal óseo, por lo cual es sumamente importante la renovación ósea periódica. Además la capa hidratada le proporciona al cristal algunas de sus propiedades físicas típicas, como su conductividad eléctrica debido a la alta movilidad de iones que presenta (Cazalbou *et al.* 2004a; Eichert *et al.* 2009).

La habilidad de intercambiar iones con el medio que presenta la capa hidratada le permite variar su composición en función de la concentración de iones del fluido biológico, lo cual depende de factores como la nutrición, intoxicaciones, patologías, etc. Los iones presentes en la capa hidratada pueden ser liberados al medio mediante dos mecanismos. Por un lado, según sus concentraciones de equilibrio pueden liberarse de forma espontánea. Por otra parte, se produce una elevada liberación de iones durante la actividad de los osteoclastos al destruir el hueso envejecido para su renovación. Varios iones, como el Sr^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , o Zn^{2+} , aún en concentraciones traza, pueden actuar sobre las células presentes en el hueso y afectar tanto la estructura, como las propiedades

mecánicas o biológicas de las apatitas que lo componen. Un ejemplo de esto es el Sr^{2+} , el cual presenta la capacidad de potenciar la actividad de los osteoblastos e inhibir la de los osteoclastos (Cazalbou *et al.* 2004b; Cazalbou *et al.* 2005).

A su vez la capa hidratada permite la adsorción de ciertas proteínas a la superficie del cristal, lo que sugiere que las apatitas actúan como reservorio de componentes orgánicos. Diversos estudios han corroborado que esta propiedad puede potenciar o inhibir la biomineralización, según la concentración de las proteínas adsorbidas. También se ha observado que la presencia de ciertas proteínas en determinadas concentraciones, pueden estabilizar la nucleación y controlar el número y tamaño de los cristales (Cazalbou *et al.* 2004b). Por tanto, la matriz orgánica es otro factor que influye en la formación de las apatitas y en la mineralización del hueso.

En resumen, es muy clara la importancia de la capa hidratada para la actividad biológica de las apatitas óseas, ya sea permitiéndole regular la homeostasis iónica de los fluidos biológicos, así como la concentración de componentes orgánicos, como proteínas colagénicas o factores de crecimiento. El estudio de estos fenómenos es muy importante no sólo para comprender su funcionamiento sino para la mejora tanto en el diagnóstico y tratamiento de patologías relacionadas a la mineralización (Bazin *et al.* 2012), así como en el desarrollo de implantes óseos. El conocimiento de las propiedades de las apatitas biológicas puede orientar particularmente al desarrollo y generación de implantes bio-inspirados, capaces de actuar como materiales de remplazo o sustitutos óseos y a su vez permitiendo la regeneración de los tejidos.

1.2 Desarrollo de implantes ortopédicos

1.2.1 Características de los implantes óseos y buco-maxilofaciales.

Los implantes ortopédicos son los más estudiados en medicina debido a su amplio y prolongado uso (Mozafari 2007). Se aplican como sustitutos óseos o dentales, y aunque cada vez se desarrollan dispositivos más eficientes y seguros, su uso aun puede acarrear problemas como el rechazo del implante, infecciones al colocarlo o removerlo, etc. Todo material sintético que sea utilizado como sustituto de un tejido se lo conoce como un *biomaterial* (León and Jansen 2009). Se han utilizado diversos materiales para el desarrollo de los mismos, como metales, polímeros, cerámicas, entre otros (León and Jansen 2009). También se han diseñado diversas formas de presentación, como polvos, bloques, o cementos (J.J. Morales de Cano and Hermoso. 2002). La elección de la presentación y el material a utilizar dependerán de las necesidades quirúrgicas (J.J. Morales de Cano and Hermoso. 2002). Dentro de los metales más comúnmente utilizados se encuentran el acero inoxidable, y las aleaciones de cromo, cobalto y titanio. Los dos últimos son principalmente utilizados para la producción de prótesis debido a su gran resistencia tanto mecánica, como a la corrosión dentro del organismo (León and Jansen 2009). Por otra parte los polímeros son materiales muy usados en prótesis específicas, como las de rótula, o como componentes o copas acetabulares, e incluso como rellenos odontológicos. Finalmente, los materiales cerámicos son utilizados tanto en implantes odontológicos como en insertos de cadera, debido a su dureza y resistencia al desgaste y corrosión (León and Jansen 2009). A los materiales cerámicos con tales aplicaciones se los

conoce comúnmente como *biocerámicos* (Xian 2009).

Los materiales biocerámicos se clasifican como inertes, superficialmente activos o reabsorbibles. Dentro de los primeros entran los materiales incapaces de interactuar con los tejidos, como la alúmina, el zirconio, y el óxido de titanio, los cuales son conocidos por ser portadores de una gran resistencia química e incapaces de ser reabsorbidos por el organismo. Los vidrios bioactivos son un ejemplo de materiales de superficie activa, y también son fuertes e incapaces de ser reabsorbidos, pero sí pueden interactuar con los tejidos que lo rodea, especialmente son capaces de estimular la osteogénesis (Xian 2009). Por último los biocerámicos reabsorbibles son materiales con una vasta aplicación, en especial en reparaciones dentales y como portadores de drogas (Xian 2009). Como lo evidencia su nombre, son materiales reabsorbibles por el organismo, además son biocompatibles, versátiles e interactúan con los tejidos óseos. Sin embargo, a diferencia de los otros biocerámicos, presentan una resistencia mecánica muy pobre y poco dúctil (Xian 2009), por lo que últimamente se ha estudiado el uso de materiales poliméricos o metálicos (como placas o tornillos) en combinación con cerámicos reabsorbibles, de modo de mejorar sus propiedades mecánicas (León and Jansen 2009; Xian 2009; Ahmed *et al.* 2011). Los biocerámicos reabsorbibles son materiales principalmente formados por compuestos fosfo-cálcicos, ya sea por hidroxiapatita o compuestos relacionados. Como se mencionó en las secciones anteriores, la hidroxiapatita es el principal mineral presente en los huesos y dientes, y por tal razón estas biocerámicas presentan la capacidad de interactuar e integrarse al tejido óseo vivo. A esta propiedad se le

conoce como *bioactividad* (León and Jansen 2009), y la presentan tanto las cerámicas reabsorbibles como las superficialmente activas (Xian 2009). La razón por la cual son bioactivas es debido a que permiten la deposición de apatitas biológicas y otras moléculas sobre el implante, ya que aumentan la concentración de fósforo y calcio en el medio. Este mecanismo permite la colonización del implante por osteoblastos, que son las células especializadas en la producción de la matriz ósea del hueso (León and Jansen 2009), produciendo así el crecimiento del hueso sobre la superficie del implante. Este último actúa como guía del tejido óseo mediante un proceso conocido como osteoconducción (León and Jansen 2009), proceso por el cual el implante permite la reparación del hueso, soportando la migración, fijación y proliferación de los osteoblastos y promoviendo la vascularización y posterior formación de la nueva matriz ósea (León and Jansen 2009; Xian 2009). Si bien los biocerámicos de fosfo-cálcicos son reabsorbibles, su solubilidad en el fluido biológico y su tasa de degradación por actividad celular son muy bajas. Por tanto va a permanecer en el organismo varios años luego de la implantación (León and Jansen 2009). Esto impone la necesidad de que el implante sea lo más biomimético posible, sin perder las propiedades mecánicas necesarias, ni la bioactividad, u osteoconductividad (León and Jansen 2009). El concepto de biomimetismo (confundirse o parecerse con lo biológico) implica que el implante tenga la composición, cristalinidad y propiedades mecánicas lo más similares posibles a las apatitas biológicas (León and Jansen 2009). Tal es el caso de los cementos de fosfato de calcio (CFC), o en particular del cemento de hidroxiapatita (CHA) (Mozafari 2007; León and Jansen 2009). Este último frente a las biocerámicas de hidroxiapatita

presenta la ventaja de endurecerse dentro del organismo. Además es un material biocompatible, resistente a infecciones, osteoconductor y bioactivo (Mozafari 2007).

Se puede concluir que el diseño de prótesis apunta a cumplir con una serie de criterios (Im *et al.* 2012). Por un lado deben ser biocompatibles, con estructuras y composición química lo más biomiméticas posibles, deben integrarse al tejido aumentando la adhesión y deposición de las células óseas para estimular el crecimiento del tejido sin generar una respuesta inmune contra la prótesis, y además deben ser porosos de modo de ayudar tanto a la migración celular como al intercambio de nutrientes (Im *et al.* 2012). Todos estos aspectos se encuentran razonablemente contemplados en el caso de los biocerámicos y cementos de hidroxiapatitas, que además cumplen con ser biodegradables para actuar como sostén al principio (bioconductor) y luego ir degradándose a medida que crece el tejido. Por último, los implantes deben poseer las propiedades mecánicas adecuadas para soportar y sostener no sólo el crecimiento del tejido, sino también las tensiones ejercidas por la actividad del individuo (Im *et al.* 2012). En este último punto son casi inigualables las prótesis metálicas, aunque carecen de la capacidad de biodegradarse y no presentan todas las propiedades favorables de las hidroxiapatitas.

1.2.2 Efectos del uso de hidroxiapatitas como revestimiento de implantes metálicos.

Las biocerámicas y los cementos formados por fosfatos de calcio, en particular por hidroxiapatita, han sido de gran importancia a nivel ortopédico. El hecho de que la

hidroxiapatita sea un material propio del organismo, le proporciona la capacidad de ser un excelente sustituto óseo. Sin embargo presenta una desventaja, y es su baja resistencia mecánica.

Por otro lado los implantes metálicos han sido utilizados desde hace años por su gran resistencia mecánica, actuando principalmente como soporte. No obstante el uso de estos materiales puede en algunos casos provocar daños al liberar iones metálicos a los fluidos biológicos debido al proceso de corrosión (Shibli and Jayalekshmi 2008). Una forma de prevenir esto es el uso de hidroxiapatita como revestimiento (Shibli and Jayalekshmi 2008). Esta puede ser aplicada de varias formas, como son la pulverización térmica sobre el implante metálico, el revestimiento por haz de iones, pulverización por plasma (*plasma-spray*), la compactación isostática en caliente, entre otras (Faig-Martí and Gil-Mur 2008; Ahmed *et al.* 2011). En este tipo de prótesis el metal desempeña un papel estrictamente estructural, brindando su resistencia mecánica, mientras que el revestimiento, al ser biocompatible, actúa como facilitador y acelerador de la integración y fijación del implante (Faig-Martí and Gil-Mur 2008). El desempeño del revestimiento va a depender de numerosos factores, incluyendo su composición, estabilidad química, estabilidad mecánica, cristalinidad, morfología, porosidad, área superficial y tamaño de cristal (Faig-Martí and Gil-Mur 2008; Ahmed *et al.* 2011).

Dado que la superficie del implante esta en íntimo contacto con los tejidos, es determinante una buena interacción e integración al mismo (Tambasco de Oliveira and Nanci 2004). Por ello el revestimiento hidroxiapatítico presenta grandes ventajas: biocompatibilidad, baja toxicidad e inmunogenicidad (Kundu *et al.*). Por otra

parte le proporciona al implante una mejor osteoconductividad, facilitando la formación y el crecimiento interno de hueso (Kold *et al.* 2006; Voigt and Mosier 2011; Hirota *et al.* 2012). Estudios recientes en modelos animales y humanos, muestran que el uso de fibras de titanio recubiertas con hidroxiapatita estimula la producción de cristales de fosfato de calcio por los osteoblastos, aumentando la tasa de formación de hueso (Hirota *et al.* 2012). Esto puede explicarse por la predisposición de la hidroxiapatita para adsorber proteínas de la matriz extracelular, lo que estimula la adhesión, proliferación y diferenciación de los osteoblastos sobre la prótesis (Faig-Martí and Gil-Mur 2008). Esta propiedad a su vez permite una mejor fijación del implante, como se ha visto en numerosos estudios pre-clínicos (Kold *et al.* 2006; Voigt and Mosier 2011). Por ejemplo esta mejora de la fijación puede ayudar en las artroplastias totales de rodilla, a disminuir la movilidad de sus componentes en etapas tempranas post-quirúrgicas y prolongarse ese efecto por hasta cerca de 10 años (Pijls *et al.* 2012).

La estabilidad del implante puede afectarse por el grosor y el tamaño de poro del revestimiento (Voigt and Mosier 2011). Según Voigt (Voigt and Mosier 2011), se consigue un implante fuerte y de mejor estabilidad y durabilidad si el grosor del revestimiento no sobrepasa el rango de 30 a 60 μm y el tamaño de poro esta en el entorno de los 150 a 425 μm . La densidad de los poros y sus interconexiones también son un factor determinante de la osteoconducción, al facilitar la vascularización, y ayudar a las células en su migración, distribución y actividad. Todas estas son cuestiones centrales al momento de estimular la formación de nuevo tejido óseo (Kundu *et al.*). Varias investigaciones demuestran que la interfaz entre el

revestimiento y el sustrato de estas prótesis presenta problemas debido a una baja adherencia, o a efectos del estrés residual sobre las fuerzas de adhesión (Shibli and Jayalekshmi 2008; Ahmed *et al.* 2011). Estos efectos pueden inducir el quiebre, rotura, o desprendimiento de las láminas de hidroxiapatita, exponiendo al metal de base a la corrosión y liberación de iones (Shibli and Jayalekshmi 2008). Se han explorado varias formas de mejorar los implantes óseos para evitar estos problemas, como es la medición de la tensión residual para modelar y desarrollar mejores pulverizados térmicos de HA (Ahmed *et al.* 2011), o el uso de materiales como el fosfato de zinc como revestimiento de la interfaz, ayudando tanto a mejorar la adherencia de la lamina de HA, como a evitar la liberación de iones metálicos en caso de ruptura de la misma (Shibli and Jayalekshmi 2008). Otra estrategia más novedosa es el uso de láminas de grosor nanométrico, que no sólo minimizan el desprendimiento del revestimiento sino que además incrementa la estimulación celular (Svanborg *et al.* 2011).

1.2.3 Efectos de la nanoestructuración de implantes.

La osteointegración de los implantes depende de varios factores, entre los cuales se encuentra la topografía de la superficie. Se ha observado que los implantes rugosos, son mejores inductores del crecimiento óseo que los lisos, mejor aún si presentan una rugosidad del orden de los micrometros (Svanborg *et al.* 2011). Sin embargo, en los últimos años y gracias a los avances en las técnicas nanoscópicas, se ha verificado la importancia de las rugosidades, pero del orden de los nanómetros (Durmus and Webster 2012). La formación de

nanoestructuras en la superficie de titanio brinda una mayor área expuesta, favoreciendo la unión de componentes proteicos de la matriz y de osteoblastos a la misma, estimulando la osteogénesis y por ende aumentando la osteointegración de la prótesis (Tambasco de Oliveira and Nanci 2004; Durmus and Webster 2012). Además disminuye la unión de las bacterias a la prótesis, lo que disminuye la probabilidad de infección (Durmus and Webster 2012).

Otra estrategia novedosa es el uso de las placas de titanio revestidas con nanopartículas de hidroxiapatita (Svanborg *et al.* 2011). Estas presentan una mejora en sus propiedades de osteoconducción, osteointegración, biocompatibilidad, y bioactividad, propiedades ya descritas para las prótesis revestidas con hidroxiapatita en la Sección anterior. Además el hecho de que el revestimiento sea nanoestructurado provee un incremento en su biomimetismo (Im *et al.* 2012). Para explicar esto es necesario recordar los conceptos de la Sección 1.1.3.2 (pág. 4) en la que se mencionan a las hidroxiapatitas nanoestructuradas como el componente principal de la matriz mineralizada. Por lo tanto es lógico considerar que los revestimientos de hidroxiapatitas nanoestructuradas tienen un mayor grado de biomimesis y un ambiente más adecuado para la adhesión y proliferación de los osteoblastos, que los revestimientos de hidroxiapatitas estequiométricas (Im *et al.* 2012).

Las nanopartículas de hidroxiapatita presentan una mejor interacción con las células de hueso debido al aumento de su área superficial, rugosidad, y humectabilidad, además de su similitud con las apatitas naturales del hueso (Im *et al.* 2012). El agregado de nanocristales de hidroxiapatitas a materiales como el

quitosano, aumentan sus propiedades de citocompatibilidad, adhesión y dispersión de los osteoblastos (Im *et al.* 2012). Varios estudios *in vitro* han evidenciado una correlación entre el incremento de la adhesión de los osteoblastos con el incremento de la nanofase (Price *et al.* 2003; Sato *et al.* 2006). Inclusive, la nanoestructuración disminuye o por lo pronto no estimula, la adhesión de otros tipos celulares competidores de los osteoblastos por los mismos sitios, como los fibroblastos o células musculares (Price *et al.* 2003). Por su parte, estudios *in vivo* en modelos animales, han mostrado que el uso de placas de titanio recubiertas con hidroxiapatitas nanoestructuradas incrementa la formación de hueso nuevo en la superficie (Svanborg *et al.* 2011). Todos estos resultados sin duda alientan a innovar en los métodos de síntesis de hidroxiapatitas nanoestructuradas, así como también en las técnicas de adhesión de las mismas a placas de titanio o polímeros.

1.3 Síntesis de Hidroxiapatitas Nanoestructuradas

A nivel biomédico se le ha dado una gran importancia a la obtención de hidroxiapatitas cada vez más similares a las biológicas para su aplicación como sustitutos óseos (Sun *et al.* 2011). A la fecha se han obtenido varias hidroxiapatitas sintéticas con sustituciones iónicas puntuales como son la carboxiapatita, estroncioapatita, fluoroapatita o fluorohidroxiapatita, entre otros, y a su vez todas estas de topografía tanto micro como nanométrica (Ma 2012). El uso de apatitas sintéticas análogas a las biológicas como modelos *in vitro*, ha permitido mejorar la comprensión tanto de los fenómenos involucrados en la biomineralización de los tejidos, como de las

propiedades fisicoquímicas de los nanocristales óseos (Bazin *et al.* 2012). A su vez un mejor entendimiento de estos fenómenos biológicos se traduce en un mejor desarrollo de prótesis biomiméticas, y en la mejor comprensión de las patologías óseas asociadas a la mineralización (Bazin *et al.* 2012).

La síntesis de cualquier nanoestructura puede realizarse mediante dos enfoques, el “*top down*” y el “*bottom up*” (Botasini 2009; Ma 2012). La diferencia entre ambos radica en que en el primero se llega al material nanoestructurado a partir de un material de topografía micro, mientras que en el segundo caso, esto se logra a partir del autoensamblaje de las moléculas utilizadas para la síntesis (Botasini 2009). Si bien las HAs nanoestructuradas pueden ser sintetizadas mediante cualquiera de los dos enfoques, el “*bottom up*” permite de manera más eficiente la obtención de nanocristales con morfologías y tamaños bien definidos, mediante el control de las condiciones experimentales durante la síntesis (Botasini 2009; Ma 2012). Por ejemplo es común el uso de agentes modificadores como pueden ser el ácido cítrico, los aminoácidos, o el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), durante la síntesis de HA por precipitación a partir de reactivos en solución (método con enfoque “*bottom up*”), de modo de controlar la nucleación y el crecimiento del cristal, y de esta forma controlar su morfología y tamaño (Zhou and Lee 2011).

Existen varios métodos de síntesis de HA nanoestructuradas, los cuales se pueden clasificar a grandes rasgos en reacciones en estado sólido y métodos en medio acuoso (Padilla *et al.* 2008; Zhou and Lee 2011). La síntesis en estado sólido es un método comúnmente utilizado para la obtención de materiales cerámicos, y que consta

básicamente de la mezcla de reactivos sólidos a altas temperaturas hasta obtener un producto en polvo o cerámico. Dentro de los métodos acuosos se pueden encontrar varias técnicas como la precipitación en solución, los métodos hidrotermales, la síntesis en microemulsión, o la síntesis en sol-gel (Padilla *et al.* 2008; Zhou and Lee 2011). También se utilizan otros métodos más mecánicos como son la síntesis mecano-química, en la cual luego de largas horas de molienda se obtiene HA de tamaño nanométrico (Zhou and Lee 2011).

A su vez se han desarrollado metodologías de síntesis de HA nanoestructuradas directamente sobre laminas de otros materiales, así como técnicas de fabricación de compuestos por deposición o pegado de las HA sobre diversos materiales (Sun *et al.* 2011; Lahiri *et al.* 2012). Esto tiene como objetivo obtener un material compuesto con características ampliamente favorables en lo que respecta a dispositivos ortopédicos (ver Sección 1.2.3). Algunos ejemplos de métodos utilizados para la fabricación de estos compuestos son el moldeo con disolvente (*solvent casting*), separación de fases por inducción térmica, técnicas de *electrospinning*, mineralización *in situ* de la HA sobre el polímero, electrodeposición, pulverización de plasma (*plasma spraying*), deposición en aerosol, aleación superficial por laser, entre otros (Sun *et al.* 2011; Lahiri *et al.* 2012).

1.3.1 Precipitación en solución acuosa

A la hora de sintetizar HA nanoestructuradas deficientes en Ca (lo más semejantes posible a las biológicas), la precipitación a partir de reactivos en solución acuosa es una de las metodologías más empleadas en varios trabajos, dado que requiere de condiciones experimentales de temperatura y pH simples

de alcanzar y con buenos resultados (Manjubala *et al.* 2001; Li *et al.* 2007; Eichert *et al.* 2009; Wu *et al.* 2009). Dependiendo de las condiciones de temperatura y pH empleadas durante las síntesis, puede obtenerse compuestos fosfo-cálcicos con fases ácidas, básicas o hidratadas, así como también compuestos con diferentes grados de cristalinidad (Eichert *et al.* 2009; León and Jansen 2009). Por ejemplo para obtener un precipitado de baja cristalinidad y con mayor deficiencia en Ca es necesario utilizar valores de pH al inicio altos (medio básico) si la temperatura es mayor a 80 °C, o valores de pH más cercanos al fisiológico si los valores de temperatura son menores a 80 °C o inclusive cercanos a la temperatura ambiente (Eichert *et al.* 2009). De todos modos, en función del tipo de apatita que se quiera sintetizar, puede haber una variación substancial de los requerimientos en cuanto a las condiciones experimentales. Otra condición importante es el tiempo de maduración post-precipitación del compuesto fosfo-cálcico, ya que de este proceso dependen varios factores como son la reactividad de la superficie (en función del tamaño de la capa hidratada), la composición general del ambiente tanto no-apatítico como apatítico, e inclusive el tamaño del cristal. Debido a esto es que el tiempo de exposición del precipitado a las aguas madres es un factor a tener en cuenta al momento de sintetizar HAs. El tiempo necesario para observar cambios en alguno de los factores es muy variable, desde algunas horas o incluso de varios días o meses (obteniendo en estos casos variaciones claras en relación al tamaño del cristal), se ejemplifica en la Figura 1.4 (Eichert *et al.* 2009).

Cuanto menor es el tiempo de maduración al que se expone el precipitado menor es su cristalinidad. Sin embargo muchos de los

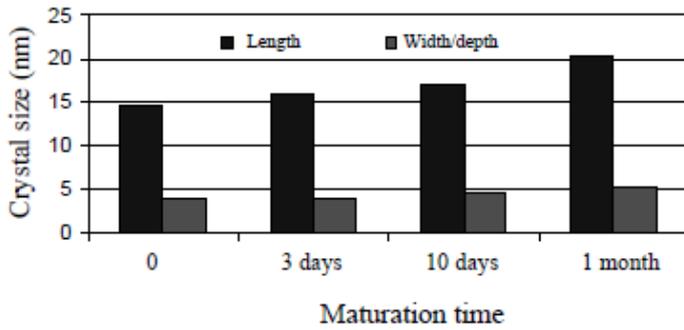


Figura 1.4. Variación del tamaño del cristal en función del tiempo de maduración. Adaptado de Ref. (Eichert *et al.* 2009)

protocolos de síntesis de HAS nanoestructuradas implican un tiempo de maduración de algunas horas al final de la síntesis. Si bien en el protocolo de síntesis de apatitas pobremente cristalinas (Eichert *et al.* 2009) recomienda no dejar madurar los nanocristales, sus resultados en relación al efecto que tiene sobre los mismos el proceso de maduración parece indicar que para observar cambios en el tamaño del cristal son necesarios algunos días de maduración. En consecuencia, algunas horas de maduración podrían afectar solamente la composición de los ambientes no-apatíticos y en menor medida de los apatíticos, pero no las dimensiones de los nanocristales (Eichert *et al.* 2009).

Cuando se mezclan soluciones acuosas concentradas de calcio y ortofosfatos (método empleado en algunas síntesis de HA) se puede obtener como primer precipitado un compuesto fosfo-cálcico amorfo que rápidamente se vuelve un compuesto cristalino más estable como son las HAs (Dorozhkin 2010). Estos compuestos que pueden precipitar son intermediarios de la síntesis de HA que aparecen en determinadas condiciones. Es posible que el dejar madurar unas pocas horas los productos de síntesis, sea una forma de evitar este tipo de compuestos ya que son sumamente inestables y rápidamente cambian a HAs.

1.3.2 Intermediarios en la síntesis acuosa de hidroxiapatitas

En determinadas condiciones, durante la precipitación de HA en medio acuoso, se forman compuestos intermedios (o precursores) que inmediatamente dan lugar a la formación de HAs. Los precursores reportados hasta el momento en la mayoría de los trabajos son el fosfato de calcio amorfo (ACP) y el octacalciofosfato (OCP). El primero de estos es un intermediario observado en soluciones altamente concentradas, se cree que es la primer fase cristalina que se forma en solución, y debido a su alta inestabilidad cambia rápidamente a una fase cristalina más estable, comúnmente OCP o HA. Dada su inestabilidad no es un compuesto fácilmente estudiado, además al ser amorfo no puede conocerse su estructura mediante difracción de rayos X. Según análisis químicos tiene una composición relativamente constante, con una estructura conocida como agrupaciones de Posner de composición: $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$. A su vez mediante análisis por Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) pudo observarse partículas en principio de forma irregular que tienden a una esfera (Dorozhkin 2010).

El otro precursor mencionado, OCP, es un compuesto termodinámicamente menos estable que la HA, y se lo ha reportado como intermediario no solo en la síntesis *in vitro*, sino también *in vivo* durante la formación de apatitas biológicas de esmalte y hueso (León and Jansen 2009). Este intermediario presenta una composición química semejante a la HA ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), con ambientes químicos apatíticos y no-apatíticos (León and Jansen 2009; Kaneko *et al.* 2011). Por este motivo, es difícil diferenciarlo mediante los espectros FTIR de la HA, y sólo por análisis por XRD pueden diferenciarse a través de los picos

característicos del OCP observables en los ángulos 4.8° , 9.6° , 9.9° y 33.7° (Eichert *et al.* 2009; Kaneko *et al.* 2011).

Existe un tercer compuesto fosfo-cálcico, el dicalciofosfato (DCPD), que se menciona como fase intermedia de las AB en la mineralización de huesos y dientes, así como también se lo relaciona a calcificaciones patológicas (León and Jansen 2009).

1.4 Caracterización de hidroxiapatitas

Así como se destacan una variedad de metodologías de síntesis de HA, es igualmente importante la correcta e inequívoca identificación del producto obtenido en la misma. Esto se logra mediante la elección de la técnica de caracterización apropiada o del conjunto de técnicas de caracterización apropiado. En el caso particular de las HAs existen principalmente un par de técnicas ampliamente utilizadas, basadas en las propiedades estructurales del producto para su identificación, lo cual les provee la precisión requerida. Estas son la difracción de rayos X (XRD, *X-ray diffraction*) y la espectroscopia infrarroja por la transformada de Fourier (FTIR, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) (Panda *et al.* 2003; Lebon *et al.* 2008; Xian 2009). Normalmente ambas técnicas son utilizadas de forma conjunta durante la caracterización de las hidroxiapatitas sintéticas (HAs). Esto se debe a que, si bien ambas técnicas generan un espectro con un patrón característico de las HAs, cada uno a su vez puede brindar información complementaria relacionada con su estructura, composición, cristalinidad, etc.

Existen otras técnicas también utilizadas para la caracterización de compuestos fosfo-

cálcicos y en particular HAs, como la Espectroscopia Raman, que es utilizada ampliamente para análisis cualitativos, identificación de grupos funcionales y moléculas estructurales, y para la elucidación de la conformación de la muestra. Por tanto es una técnica que aporta información de una variedad de aspectos estructurales, expresados como frecuencia, intensidad y factores de despolarización. Muchas de las bandas de Raman aparecen por IR también aunque con diferencias o en la frecuencia o en la intensidad; de todos modos a ambas técnicas se las pueden considerar complementarias (León and Jansen 2009). Otra técnica empleada es la resonancia magnética nuclear (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*), la cual permite obtener mayor información estructural de la HA, como por ejemplo al estudiar el ambiente que rodea los átomos de P, o H o Ca que lo componen. Tiene la particularidad de que puede obtenerse el espectro de cada núcleo (^1H o ^{31}P) por separado en cada experimento, de modo que los resultados no se solapan y por tanto su interpretación se simplifica notoriamente (Panda *et al.* 2003; León and Jansen 2009). Otra de las técnicas empleadas es la Espectroscopia de Fotoelectrones de rayos X (XPS, *X-ray Photoelectron Spectroscopy*), la cual si bien puede aportar información con respecto al entorno molecular, principalmente es una herramienta muy útil a la hora de conocer la cantidad y el tipo de elementos presentes en un área determinada y a una profundidad de 1 a 10 nm. Existen otras técnicas capaces de aportar este tipo de información, como las técnicas de irradiación con haces de iones, o la espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS, *Energy Dispersive Spectrometry*). Esta última generalmente implica un espectrómetro acoplado a un microscopio electrónico de barrido (SEM,

Scanning Electron Microscopy). Finalmente, el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM, *Transmission Electron Microscopy*) se utiliza para la caracterización y medición de los cristales que componen la HA (Panda *et al.* 2003).

1.4.1 Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS).

El EDS permite obtener la composición elemental del material de forma cualitativa, e inclusive cuantitativa siempre que se compare el resultado con patrones de concentración conocida de un elemento mediante un procedimiento conocido como análisis de fluorescencia de absorción de número atómico (ZAF). El EDS consta en la irradiación de una muestra sólida con un haz de electrones, ionizando los átomos de la misma, y por ende excitando los electrones de la muestra a niveles de energía superiores. Los mismos se estabilizan, decayendo a niveles de energía vacantes, y emitiendo fotones de rayos X con una energía correspondiente a la diferencia entre los dos niveles energéticos. Tal radiación es detectada y analizada por el equipo otorgando información cualitativa respecto a la identidad de los elementos que están presentes en el área analizada. En muchos casos es necesario tener en cuenta al momento de aplicar esta técnica el grosor de la muestra, el tipo de sustrato, la profundidad de penetración del haz de electrones, y la capacidad de salir los rayos X emitidos en las zonas más profundas (León and Jansen 2009).

1.4.2 Técnica de Difracción de rayos X (XRD)

1.4.2.1 Bases de la técnica XRD

El XRD es una técnica de análisis estructural basada en el fenómeno de difracción de ondas, que se da por la interferencia causada por un objeto de dimensiones similares a la longitud de onda (λ) de la radiación con la que se irradia el material a analizar (Atkins 1999; Xian 2009). En este caso concreto se utiliza como radiación los rayos X, los cuales presentan longitudes de onda del orden de los 10^{-10} m, el mismo orden que presentan los enlaces moleculares y las distancias atómicas, por tanto estos últimos son capaces de difractar los rayos X (Atkins 1999). También pueden ser difractados por las moléculas en sí, las capas finas sólidas y las superficies (Atkins 1999). La desviación generada por la difracción provoca que los rayos X interfieran entre sí, lo que induce variaciones en la intensidad de la radiación, ya sea amplificándose cuando los desplazamientos están en fase, como sería en el caso que coincidan los máximos o los mínimos entre sí (interferencia constructiva), o reduciéndose o incluso anulándose cuando los desplazamientos no están en fase, como en el caso de coincidir los máximos con los mínimos (interferencia destructiva) (Atkins 1999; Xian 2009). Por tanto para poder observar la difracción de los rayos X es necesario que se produzca un haz intenso generado por interferencia constructiva, dada por la reflexión de las ondas en cada átomo (Atkins 1999). Para que esto ocurra las ondas reflejadas deben estar en fase, es decir que la diferencia entre sus recorridos debe ser un número entero múltiplo de la longitud de onda. A su vez esto depende del ángulo de incidencia (Θ), el cual es el ángulo formado entre el haz incidente y el plano de la red que refleja dicho haz. Cuando el

ángulo Θ cumple la ley de Bragg ($n\lambda = 2.d.\text{sen}\Theta$) se genera interferencia constructiva, lo cual a su vez produce un aumento de la intensidad que se corresponde con un pico en el perfil de difracción, se ejemplifica en la Figura 1.5. (Atkins 1999; Xian 2009). Esto se repite con cada ángulo que cumpla la ley de Bragg para un plano cristalino en particular (Xian 2009). Estos planos se distinguen mediante una serie de índices conocidos como índices de Miller (hkl), correspondientes a los recíprocos de las distancias de intersección del plano con los ejes a , b y c dados por los lados de la unidad de celda o celda unidad o unitaria (Atkins 1999). Por tanto son capaces de indicar la ubicación y orientación espacial

de los planos dentro de la estructura cristalina (Xian 2009). A su vez estos índices se asocian con los picos presentes en los perfiles de difracción, por tanto esta técnica es capaz de brindar una importante cantidad de información estructural (Atkins 1999; Xian 2009).

1.4.2.2 Métodos de difracción de rayos X.

Se han utilizado distintos métodos para aplicar la difracción de rayos X al análisis estructural de muestras cristalinas. En sus comienzos Von Laue propuso una metodología que consistía en irradiar un monocristal, con una amplia gama de

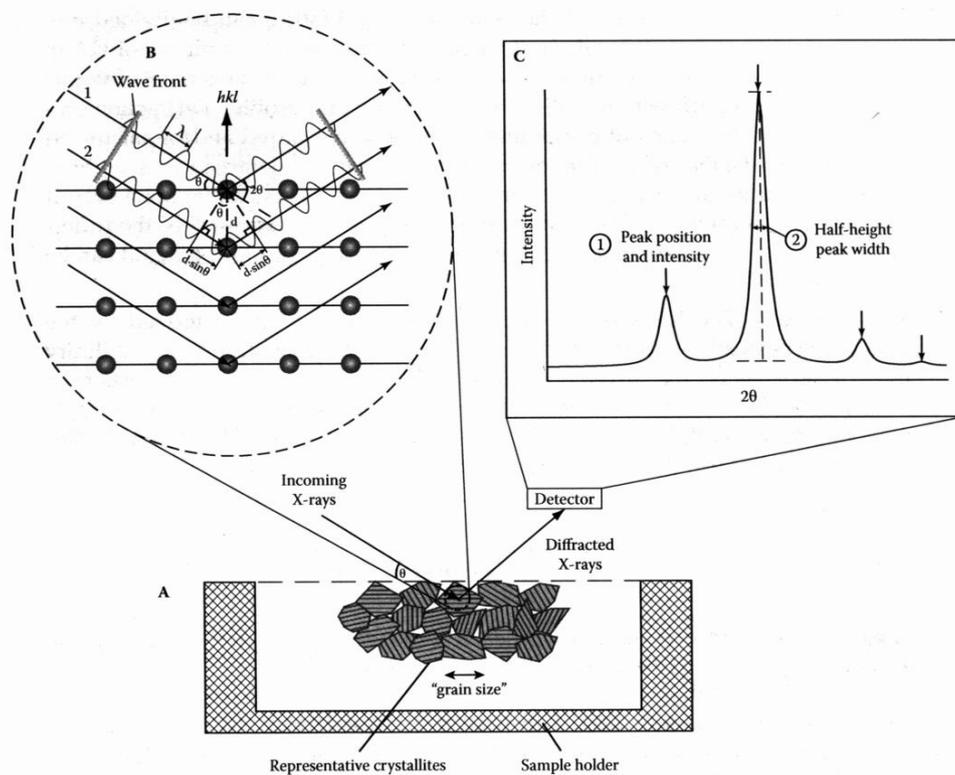


Figura 1.5. Difracción de rayos X. (a) Se representan los cristales de una muestra en polvo orientados de forma azarosa. El tamaño promedio de esos cristallitos se los denomina "grain size". Se irradia la muestra con rayos X, siendo el ángulo del rayo incidente Θ , y el ángulo difractado 2Θ . (b) Se observan las moléculas y sus respectivos planos determinados por los índices hkl . El rayo difractado 2 presenta un recorrido de $2.d.\text{sen}\Theta$ mayor que el rayo difractado 1. Si la diferencia de recorridos es múltiplo de λ entonces se cumple la ley de Bragg y por tanto se genera interferencia constructiva entre los rayos difractados dando una señal de mayor intensidad. Dicha señal es registrada por el detector y expresada como un perfil de Intensidad en función del ángulo 2Θ , ver (c). El patrón de intensidades del espectro es una "huella dactilar" de la muestra y el ancho de media banda marcado como "linewidth" en la (c), es lo que permite calcular la cristalinidad de la muestra. Adaptado de Ref. (Xian 2009).

longitudes de onda de rayos X, de modo de que alguna de esas λ cumplan la ley de Bragg (Atkins 1999). Existe un método alternativo desarrollado por W.L. Bragg y W.H. Bragg que se basa principalmente en irradiar con una fuente monocromática de rayos X un monocristal que va rotando de modo de obtener finalmente un espectro en el cual se ve representada la reflexión producida para cada ángulo en los cuales los distintos planos cumplen con la ley de Bragg (Atkins 1999). Sin embargo no siempre se cuenta con una muestra cristalina bien formada como monocristal, o en algunos casos es laborioso buscar los ángulos apropiados. En vez de esto es posible analizar muestras en forma de polvos irradiándola con una fuente de radiación monocromática, de acuerdo con la metodología desarrollada por Debye-Scherrer (Atkins 1999).

Dado que la muestra está en forma de polvo, los cristales que lo componen se orientan en todas direcciones y de forma azarosa, por lo que solo algunos cristales van a tener la orientación correcta para que se cumpla la ley de Bragg para un conjunto de planos en determinado Θ , Figura 1.5 (a) (Atkins 1999). Cada conjunto de planos presente en el cristal va a producir difracción para los distintos Θ , dado que del conjunto de cristales, siempre algunos van a estar orientados de forma correcta (Atkins 1999). Si tomamos como ejemplo un conjunto particular de planos presentes en varios cristales orientados alrededor del haz incidente pero con diferente inclinación, los rayos difractados van a formar un cono en torno al haz incidente Figura 1.6. El ángulo de incidencia es de Θ , por tanto la reflexión genera un haz con un ángulo de 2Θ con respecto a la dirección del haz incidente. Esto significa que el cono tiene un semiángulo de 2Θ con respecto al haz incidente, que pasa por el centro del mismo

(Atkins 1999). En resumen cada conjunto de planos que cumpla la ley de Bragg va a generar un cono y por tanto el total de los conos generados por todos estos conjuntos de planos da lugar al patrón de difracción de la muestra completa. Finalmente los conos de intensidad son detectados electrónicamente y generan un patrón que se muestra como una gráfica o espectro en donde la intensidad es representada en el eje de las ordenadas y el ángulo de difracción 2Θ en el eje de las abscisas, como se puede apreciar en los espectros de las Figura 1.5 (c) y Figura 1.7 (Atkins 1999; Xian 2009).

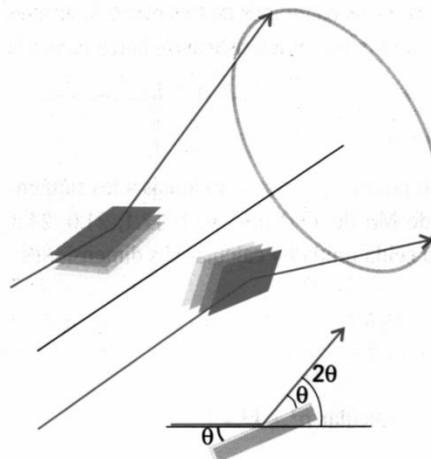


Figura 1.6. Cono de haces difractados. En una muestra en polvo, algunos cristales están orientados de forma azarosa, y siempre algunos cristales están orientados de tal forma que para un conjunto de planos (hkl) dado cumplen la ley de Bragg. En la figura se observan dos cristales con diferente orientación alrededor del haz incidente, en donde el mismo conjunto de planos que satisface la ley de Bragg, difracta el haz, de ángulo incidente Θ , dando lugar a un par de rayos, de ángulo de difracción 2Θ , que se sitúan sobre un cono. Si tomamos en cuenta el total de cristales de la muestra, todos los que estén orientados alrededor del haz incidente de forma que el mismo conjunto de planos (hkl) cumpla la ley de Bragg, van a difractar el haz incidente formando dicho cono. Todos los planos que cumplan la ley de Bragg van a dar lugar a sus correspondientes conos, los cuales en su conjunto forman el patrón de difracción de la muestra. Adaptado de Ref. (Atkins 1999).

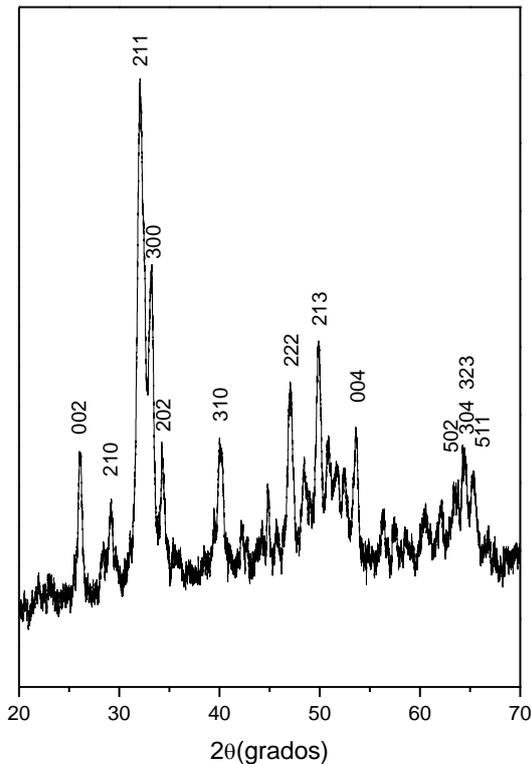


Figura 1.7. Espectro XRD de una hidroxiapatita comercial.

1.4.2.3 Aplicaciones de la difracción de rayos X

La difracción de rayos X es una técnica de gran aplicabilidad en una vasta variedad de disciplinas de la ciencia así como también en varias áreas de desarrollo tecnológico e industrial

[http://es.wikipedia.org/wiki/Cristalograf%C3%ADa_de_rayos_X#Aplicaciones]. Dentro del área de la química, es una técnica sumamente conveniente a la hora de estudiar las propiedades estructurales de las muestras, como es la distancia entre los planos de una red, las dimensiones de la unidad de celda (al establecer los valores de los índices hkl), la cristalinidad de la muestra, así como también permite identificar la muestra en sí, deducir su estructura y hasta su configuración estequiométrica absoluta, entre otras (Atkins 1999; Xian 2009). Es interesante enfocarse en dos aplicaciones puntualmente: la identificación de muestras cristalinas, y la obtención de los tamaños de cristalitas.

En cuanto a la identificación de muestras, el espectro XRD presenta un patrón característico actuando como “huellas dactilares” de la estructura cristalina, ya que una variación en la posición de los átomos dentro de la celda unidad afectaría los patrones de XRD. A su vez, a partir de estos espectros es posible conocer las diferentes propiedades estructurales ya mencionadas anteriormente, como es por ejemplo la determinación del tamaño promedio de las nanopartículas cristalinas, o el tamaño de cristalita de una muestra nanocristalina (Holzwarth and Gibson 2011). Esto último se ejemplifica en la Figura 1.5 (c), en la cual se observa como a través de la medición del ancho del pico en la parte media de su intensidad máxima (*line width*) es posible calcular el tamaño de cristalita. Para ello es necesaria la utilización de la ecuación de Scherrer:

$$D_{hkl} = K\lambda / (B_{hkl} \cdot \cos\Theta)$$

en donde D_{hkl} es el tamaño de cristalita perpendicular al plano, hkl son los índices de Miller de los planos analizados, K es un factor numérico relacionado generalmente a la forma de la cristalita, λ es la longitud de onda de los rayos X, B_{hkl} es el ancho total del pico en la mitad de su altura con dimensiones en radianes, y Θ es el ángulo de Bragg.

Es importante destacar que esta ecuación tiene una limitante en relación al tamaño de cristalita máximo que es posible determinar, siendo esta cota superior del orden de los 100 a 200 nm, dependiendo del instrumento, la muestra, la relación señal ruido, etc. Esta limitación se debe a que el ensanchamiento del pico no solo se corresponde con el tamaño de cristalita, sino que también es afectado por otros factores tanto instrumentales como no instrumentales. Por tanto a mayores

tamaños de cristalita menor es el ensanchamiento del pico y por ende mayor es la dificultad para diferenciar si el mismo se debe al tamaño de cristalita o a otros factores (Holzwarth and Gibson 2011).

1.4.3 Espectroscopia de absorción infrarroja

1.4.3.1 Aspectos generales

En la espectroscopia infrarroja convencional se irradia una muestra con una fuente de radiación monocromática, y se registra su absorción mientras se va variando la frecuencia dentro de un rango comprendido en el infrarrojo. También existen técnicas en las que se irradia con radiación policromática dentro del infrarrojo y se registra el patrón de absorción. Sea de una u otra forma la energía que provee esta radiación no es capaz de inducir la transición electrónica de átomos o moléculas, pero si es capaz de generar cambios en los estados rotacionales y vibracionales de moléculas, tanto orgánicas como complejos metálicos de enlace covalente (Atkins 1999; Skoog; *et al.* 2005). De esta forma se obtiene espectros de absorción del infrarrojo en donde las bandas tienen contribuciones tanto de los cambios de niveles cuánticos vibracionales, como de los cambios de niveles rotacionales para cada estado vibracional (Skoog; *et al.* 2005). Los cambios de niveles rotacionales se resuelven claramente en el espectro de moléculas de muestras gaseosas, sin embargo se pierde en muestras líquidas o sólidas debido a que al estar más condensadas se generan colisiones azarosas (Atkins 1999; Skoog; *et al.* 2005). De este modo los estados rotacionales de las moléculas tienen un tiempo de vida corto y energías poco definidas dado que apenas giran algunos grados antes de colisionar con

otra molécula y cambiar su estado de rotación (Atkins 1999). Esto es una ventaja cuando se realizan análisis químicos cualitativos de una muestra ya que simplifica el espectro, dando lugar a bandas simples, con cierto espesor, poco espaciadas, sin ramificaciones, y en particular con frecuencias e intensidades características de cada molécula o grupo funcional (Atkins 1999; Skoog; *et al.* 2005). Por tanto al comparar el espectro generado por la vibración de las moléculas de una muestra (espectro infrarrojo) con patrones tabulados de números de onda e intensidad, puede identificarse las moléculas presentes en esa muestra (Atkins 1999). Debido a esto es que son ampliamente usadas para los análisis cualitativos; no así para los análisis cuantitativos, para los cuales son usados con mucha menor frecuencia dado que las medidas de absorbancia en infrarrojo son mucho menos precisas que en UV-visible. La ventaja que podrían tener las primeras sobre estas últimas para análisis cuantitativos radica en su alta selectividad (Skoog; *et al.* 2005).

El número de modos vibracionales que presente una molécula va a depender del número de átomos que posea, ya que todas las longitudes y ángulos de cada enlace van a poder variar al vibrar (Atkins 1999; Skoog; *et al.* 2005). Por ejemplo las moléculas diatómicas solo tienen un modo de vibración, estirando y acortando su enlace intermolecular. A medida que las moléculas presentan mayor número de átomos (N) aumenta notoriamente su número de modos de vibración independientes, totalizando $3N-5$ en caso de moléculas lineales y $3N-6$ en caso de no lineales (Atkins 1999). Estas relaciones surgen de restarle a la cantidad total de desplazamientos que presenta cada átomo para cada una de sus tres coordenadas ($3N$), los desplazamientos

asociados a la translación de la molécula (3) y los desplazamientos asociados a la rotación de los átomos (2 para las lineales y 3 para las no lineales), obteniendo como resultado solo los desplazamientos relacionados con los modos de vibración. Dado que las moléculas poliatómicas presentan un gran número de formas de vibrar diferentes, varias de estas pueden combinarse linealmente para dar lugar a los distintos modos normales de vibración, lo cual simplificaría la forma de describir las vibraciones de estas moléculas. Los modos normales de vibración son vibraciones armónicas y colectivas de toda la molécula, es decir son desplazamientos relativos de los átomos o grupos de estos que se da de forma coordinada entre sí, y a su vez de forma independiente de otros modos, lo que significa que pueden ser excitados sin excitar o modificar otros modos normales. Tomando como ejemplo el CO_2 , se pueden identificar tres modos normales de vibración. Uno de ellos es el ν_1 que implica la tensión simétrica de los enlaces CO estirándose y acortándose de forma simultánea. Otro modo normal es ν_2 que corresponde a la flexión de los enlaces CO. Y por último ν_3 que también corresponde a la tensión del enlace CO pero de forma anti-simétrica es decir que mientras un enlace CO se acorta el otro se estira. Estos tres modos son totalmente independientes en el sentido que la excitación de uno no implica la excitación del resto. A su vez son movimientos coordinados y colectivos de los movimientos vibracionales de cada enlace, los cuales no son independientes entre sí. Por ejemplo el movimiento de un solo O en relación al C en modo de tensión del enlace CO hace que varíe el centro de masa de la molécula y eso sumado al movimiento del C genera inevitablemente el movimiento del otro enlace CO, obteniendo así un modo normal de vibración ya sea simétrico (ν_1) o anti-

simétrico (ν_3). Este ejemplo es relativamente sencillo, en donde se pueden ver modos normales de vibración correspondientes solo a tensión y solo a flexión, sin embargo en la mayoría de las moléculas poliatómicas los modos normales de vibración son combinaciones de tensión y flexión del enlace internuclear.

Es importante destacar que la vibración de una molécula es activa en el infrarrojo, es decir que la molécula absorbe el infrarrojo y produce una señal, cuando cumple con la condición de que el momento dipolar eléctrico de la molécula (μ) varíe al vibrar la misma. En otras palabras un modo normal de vibración es activo si su movimiento genera una variación del momento dipolar. A esta condición se la conoce como regla de selección general. Dado que el momento dipolar depende de la situación de los electrones y núcleos en la molécula, el movimiento relativo de los núcleos modifica la distancia entre ellos, provocando así la variación del momento dipolar. Este dipolo oscilante a su vez interacciona con el campo electromagnético haciéndolo oscilar, dicha interacción también ocurre a la inversa. Cuando el dipolo oscila a la misma frecuencia que el campo electromagnético se está dando una transición vibracional (lo que se conoce como absorción de radiación en el infrarrojo) y por tanto se obtiene una señal. El hecho de que exista un momento dipolar oscilante en la molécula no implica necesariamente que ésta deba presentar un dipolo permanente, por el contrario moléculas no polares como el CO_2 también son activas en el infrarrojo, es decir presentan vibraciones activas, dado que estas provocan la aparición del momento dipolar. Este último a su vez no varía con todos los modos de vibración. Si retomamos el ejemplo del CO_2 , el modo normal vibracional ν_1 (correspondiente a la tensión

simétrica de los enlaces CO) no modifica el μ dado que su movimiento al ser simétrico mantiene el dipolo en cero. Similar a este ejemplo es el modo de vibración que presentan las moléculas diatómicas homonucleares, el cual es único e inactivo en el infrarrojo, ya que se ejerce una tensión sobre el enlace que se va estirando y acortando, lo cual evidentemente no modifica el momento dipolar (Atkins 1999).

1.4.3.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).

A lo largo del tiempo se han diseñado distintos tipos de instrumentos que trabajen en el infrarrojo, como espectrómetros dispersivos, no dispersivos y fotómetros de filtro. Durante una época fue muy utilizado el espectrómetro de dispersión, el cual es un instrumento diseñado para el análisis químico cualitativo, normalmente de doble haz muy similar al espectrofotómetro UV-Vis (Skoog; *et al.* 2005). Con el tiempo fue prácticamente desplazado por un instrumento no dispersivo conocido como espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR), debido a que este último presenta numerosas ventajas como son rapidez, sencillez y fiabilidad, además de presentar una mayor relación señal/ruido, mayor pasaje de radiación a través de la muestra (de 10 a 200 veces más), mayor exactitud en la calibración de la longitud de onda, y de carecer de problemas relacionados a la dispersión de la luz y emisión de IR (Skoog; *et al.* 2005). El que sea no dispersivo implica que no utiliza monocromador, sino que mediante un interferómetro se detecta y registra continua

y simultáneamente todas las longitudes de onda, obteniendo así patrones de interferencia que luego darán lugar a un espectro mediante la aplicación del método de transformada de Fourier (Atkins 1999; Skoog; *et al.* 2005). Este método es principalmente utilizada en la espectroscopía infrarroja aunque es también compartida por otros tipos de espectrómetros (Atkins 1999). La capacidad de registrar todas las longitudes de onda simultáneamente y de forma continua es una de las principales ventajas que presenta, además de brindarle una mayor sensibilidad (Atkins 1999). Estos equipos tienen un interferómetro característico conocido como interferómetro de Michelson (Atkins 1999; Skoog; *et al.* 2005). Este dispositivo tiene la particularidad de poseer un divisor de rayos, que consta de un espejo parcialmente reflexivo lo que permite que el rayo de luz incidente sea en parte reflejado y en parte transmitido. Además del divisor de rayos, el interferómetro cuenta con dos espejos (uno móvil y otro estacionario), un detector y una fuente de luz monocromática o policromática, dispuestos como se muestra en la Figura 1.8 (Skoog; *et al.* 2005). La función principal del interferómetro es dividir el haz de luz proveniente de la fuente, e introducir una diferencia variable en sus recorridos, para que al llegar al detector interfieran de forma constructiva o destructiva, dando lugar a un patrón de interferencia (Atkins 1999; Skoog; *et al.* 2005). Al ir desplazando el espejo móvil de forma constante, se va modificando la diferencia entre las trayectorias de los haces, lo cual hace variar la diferencia de fases y por ende la señal de intensidad que recibe el detector (Skoog; *et al.* 2005).

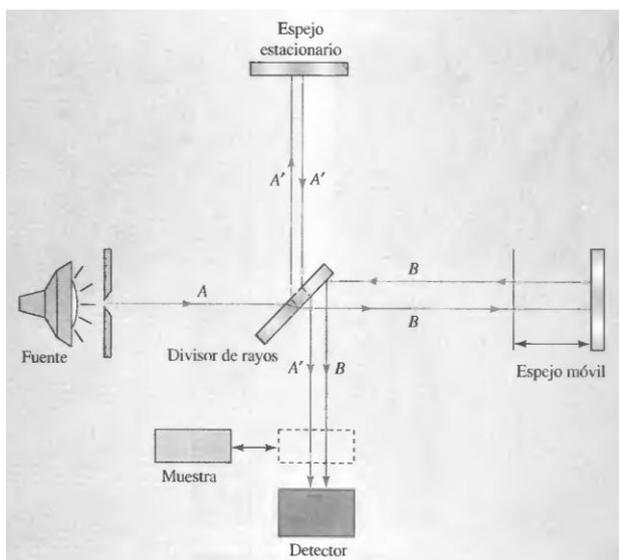


Figura 1.8. Interferómetro de Michelson. El rayo incidente A al llegar al divisor de rayos en parte es reflejado (rayo A') y en parte es transmitido (rayo B). Los rayos A' y B recorren dos distancias diferentes y convergen colinealmente en el mismo punto sobre el detector, generando así un patrón de interferencia. El espejo móvil permite modular la señal. El detector registra el interferograma de la muestra al colocar la misma frente al detector, indicado como un recuadro de líneas punteadas. Con el interferograma de referencia y el de la muestra se obtiene el espectro de absorción de la muestra. Adaptado de (Skoog; *et al.* 2005).

El objeto del movimiento preciso y uniforme (en forma de barrido) del espejo es el poder modular tanto la intensidad con la que sale el haz del interferómetro, como todas las longitudes de onda que emita de forma simultánea (Skoog; *et al.* 2005). Esto hace que el detector registre un patrón de intensidad (I) determinada, en función del movimiento del espejo (x), denominado interferograma. En la Figura 1.9 (a) se pueden apreciar el interferograma de una hidroxiapatita comercial. A este se le aplica mediante una interfaz computacional la operación matemática conocida como transformada de Fourier, la cual reduce la señal original representada como $I(x)$ a un conjunto de sinusoides de frecuencia conocida, obteniendo así el espectro buscado de potencia (expresada normalmente como transmitancia o absorbancia) en función de la frecuencia (expresada normalmente como número de onda) (Skoog; *et al.* 2005). En forma muy

simplificada podríamos decir que la transformada de Fourier transforma la función $I(x)$ (interferograma) dependiente del desplazamiento del espejo (x), a una función $S(\nu)$ (espectro) dependiente del número de onda (ν). Ambos x y ν se relacionan de la siguiente forma: $\Delta\nu = 1/(N\Delta x)$, siendo $\Delta\nu$ la variación del número de onda, N el número total de puntos digitalizados, y Δx la variación de la distancia del espejo (Jung 2008). A su vez la intensidad se relaciona con la transmitancia de forma $T=I/I_0$, siendo T la transmitancia, I_0 la intensidad del rayo incidente, e I la

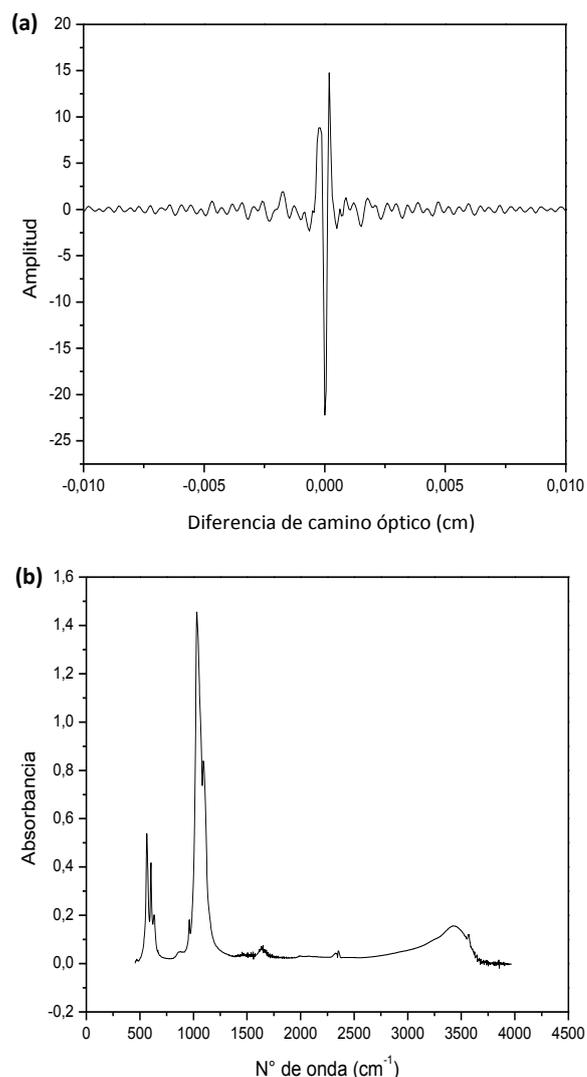


Figura 1.9. Ejemplo de interferograma y su respectivo espectro. (a) Interferograma de una hidroxiapatita comercial. (b) Espectro FTIR correspondiente al interferograma (a).

intensidad del rayo proveniente de la muestra. Por tanto el espectro se expresa como $T(\nu)$ (transmitancia en función del número de onda) (Atkins 1999). En muchos casos por comodidad se pasa de transmitancia a absorbancia (A), cuestión que resuelve fácilmente el software del equipo al aplicar el $-\log_{10}$ a la transmitancia ($A=-\log_{10}T$), obteniendo el espectro como $A(\nu)$ (Atkins 1999; Jung 2008).

En la Figura 1.9 (b) se puede ver un ejemplo del espectro obtenido por la trasformada de Fourier a partir del interferograma de la parte (a) de la misma figura. A la hora de obtener el espectro de una muestra, como el que se observa en la mencionada figura, se debe de realizar dos interferogramas. Primero uno de referencia sin colocar la muestra ante el detector, aportando solo información proveniente de la fuente, y el segundo sería el interferograma obtenido al colocar la muestra en la celda frente al detector, la cual al absorber radiación infrarroja atenúa los rayos presentes en él (Skoog; *et al.* 2005; Jung 2008). La diferencia entre estos dos interferogramas y por ende entre sus respectivos espectros $S(\nu)$, está

relacionada estrictamente a la absorción de la muestra en el infrarrojo. Por tanto el espectro de la transmitancia de la muestra, $T(\nu)$, se obtiene mediante la relación entre el S de la muestra y el S de referencia ($S_{\text{muestra}}/S_{\text{referencia}}$) (Jung 2008).

Al igual que en la técnica de difracción de rayos X, los espectros de absorción infrarroja también pueden utilizarse completos como patrones para la identificación de muestras incógnita (Skoog; *et al.* 2005). Particularmente estos espectros poseen una vasta información de la composición de la muestra, dado que cada banda que presentan corresponde un modo normal de vibración de algún grupo funcional o grupo de moléculas (Atkins 1999; Boskey and Mendelsohn 2005; Skoog; *et al.* 2005). Se muestra un ejemplo en la Figura 1.10 de una lámina de carboxiapatita, en la cual se indican algunos de los modos de vibración de los grupos funcionales correspondientes a las bandas que componen el espectro.

Es común que algunas de las bandas queden solapadas, en esos casos para poder conocer las bandas individuales que contribuyen al

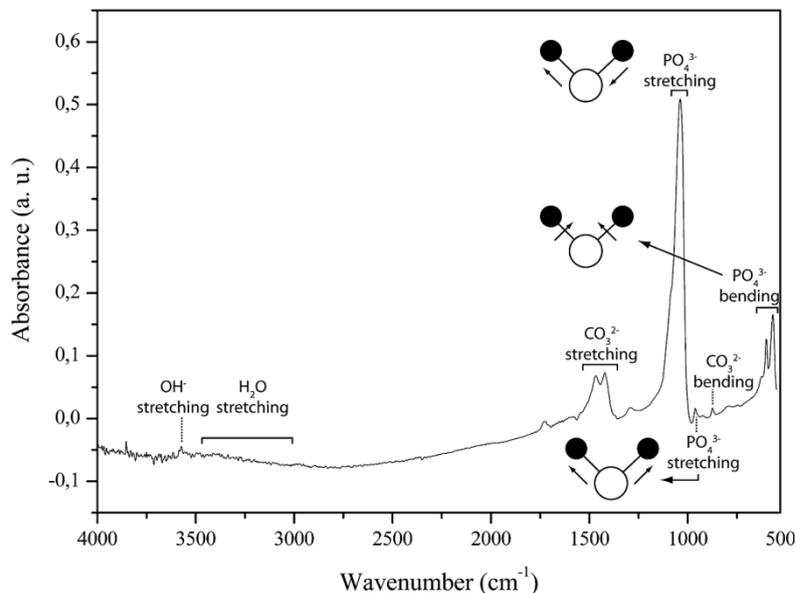


Figura 1.10. Espectro FTIR de una lámina de carboxiapatita. En la misma se indican algunos de los modos de vibración de las moléculas que dan lugar a las bandas de absorción que componen el espectro. Adaptado de (León and Jansen 2009).

solapamiento es necesaria la aplicación de ciertos procedimientos matemáticos que permitan resolver mediante una buena aproximación la complejidad de tales espectros. Uno de los procedimientos empleados comúnmente es la deconvolución gráfica, la cual consta de dos etapas: en primer lugar el ajuste a una función matemática por iteraciones sucesivas mediante la utilización de un algoritmo adecuado; en segundo lugar la deconvolución misma, según el número de bandas de absorción que componen la curva del espectro. El algoritmo más utilizado para el ajuste no lineal de curvas por mínimos cuadrados es el de Marquardt, el cual se basa en una búsqueda de gradiente como paso inicial, llegando a valores mínimos de la suma de los cuadrados de los residuos (χ^2), seguido de una linealización por desarrollo en serie de Taylor. Este procedimiento se repite hasta que el valor estimado de χ^2 no varíe más de un 0.1 % o se correlacione con un valor aportado por el operador. Para el uso de este algoritmo es necesario ingresar los valores de los máximos esperados, los cuales pueden diferir del valor "real" hasta en un 50% sin afectar la convergencia final. Este algoritmo es el utilizado por varios programas computacionales dado su superioridad al momento de estimar los parámetros frente a otros algoritmos. Los diversos programas presentan una variedad de herramientas de deconvolución capaces de obtener distintos grados de resolución (Méndez 2001).

Al igual que para las bandas visibles a simple observación, es posible adjudicarle un grupo de moléculas a cada una de las bandas obtenidas mediante la deconvolución, como se observa en la Figura 1.11, ya que son igualmente bandas de absorción que corresponden a las transiciones vibracionales de las moléculas, quedando

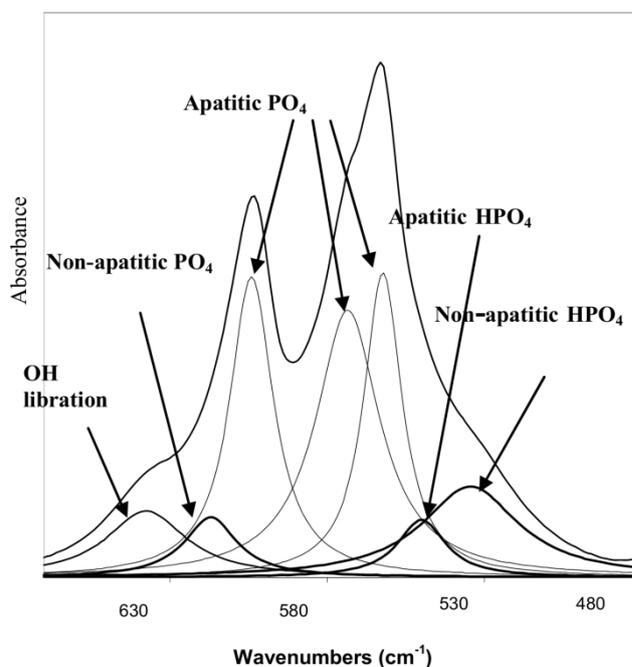


Figura 1.11. Deconvolución gráfica de la banda $\nu_4\text{PO}_4$ mediante el programa Gram/32 (Galactic Industries Corporation) (Eichert *et al.* 2009).

solapadas, y componiendo las regiones del espectro. Esto nos permite conocer todos los números de onda correspondientes a los distintos grupos funcionales presentes en una muestra estándar (Atkins 1999; Skoog; *et al.* 2005). De esta forma es posible conocer que grupos de moléculas componen la muestra, generar tablas con los correspondientes números de ondas para cada uno de ellos, y bibliotecas espectrales de los distintos compuestos, de modo que al comparar con muestras incógnita poder identificar su naturaleza y composición. Esto es especialmente útil cuando se quiere identificar muestras que pueden presentar una variedad de sustituciones en su estructura, como es el caso de las hidroxiapatitas. Es decir que mediante la comparación de una hidroxiapatita incógnita (como sería una muestra biológica) con una biblioteca espectral podría identificarse qué tipo de sustitutos presenta la muestra incógnita, ya sea de forma directa al observar las bandas correspondientes a los grupos funcionales incorporados, como de forma indirecta al observar las variaciones

de las bandas de absorción de los grupos funcionales propios de la muestra (principalmente PO_4^{3-} , OH^-), según como afecten a sus modos de vibración las distorsiones estructurales generadas por la incorporación de determinados sustitutos (por ejemplo, cationes metálicos o aniones monoatómicos) (Boskey and Mendelsohn 2005; Rintoul *et al.* 2007). Esto último nos indica que es posible identificar los distintos ambientes químicos en función de las posiciones de las bandas de absorción de las moléculas, dado que estas últimas presentan estados vibracionales dependientes del entorno molecular que los rodea. Por ejemplo, teóricamente solo las vibraciones de flexión (*bending*) y de extensión asimétrico (*asymmetric stretching*) del PO_4 son activos en IR, sin embargo se ha observado que en ciertos compuestos sólidos se vuelven activos los otros dos modos de vibración, el de extensión simétrica (*symetric stretching*) y el de deformación en tijera (*scissors deformational vibration*) (Jastrzebski *et al.* 2011). Otro ejemplo sería el comparar la deconvolución gráfica de la banda ν_4 del fosfato de una hidroxiapatita estequiométrica con una no-estekiométrica, observando en esta última la aparición de bandas adicionales correspondientes al PO_4^{3-} y HPO_4^{2-} situados en ambientes no-apatíticos, Figura 1.11 (Eichert *et al.* 2009). Lo mismo ocurre con el CO_3^{2-} , mediante la deconvolución gráfica de sus bandas es posible distinguir si es del tipo A o B, o si se encuentra ubicado en un ambiente no-apatítico. Por tanto, el empleo de la técnica FTIR permite distinguir un grupo funcional presente en un ambiente apatítico de uno no-apatítico, siendo para el caso de las hidroxiapatias principalmente las bandas del PO_4^{3-} y HPO_4^{2-} las que delatan la presencia de tales ambientes.

Por último mediante la técnica FTIR es posible obtener información adicional sobre las estructuras cristalinas como es su cristalinidad (Lebon *et al.* 2008). Esto se logra mediante el cálculo de índices de cristalinidad, como es por ejemplo el factor de división SF (del inglés *splitting factor*), el cual se basa en el grado de separación de dos bandas anti-simétricas del fosfato, o la relación entre las bandas 1030/1020 y 1060/1075, también correspondientes a la banda del fosfato.

En función de lo mencionado se puede concluir que la técnica FTIR es una herramienta muy útil a la hora de estudiar las apatitas, es posible diseñar bibliotecas espectrales y tablas que permitan identificar rápidamente las sustituciones, la presencia de ambientes apatíticos y no-apatíticos, y el grado de cristalinidad de las apatitas tanto biológicas como sintéticas, mejorando la comprensión sobre las mismas y la capacidad de obtener apatitas sintéticas cada vez más biomiméticas.

2 OBJETIVOS

Confecionar una biblioteca espectral de FTIR utilizando apatitas nanoestructuradas sintéticas, que permita la identificación de las apatitas biológicas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar y caracterizar por FTIR y XRD cuatro apatitas nanoestructuradas conteniendo diferentes sustituciones: fluoruro, carbonato, estroncio y oxhidrido.

2. Distinguir por FTIR la existencia de ambientes apatíticos y no-apatíticos en las muestras sintetizadas.
3. Diseñar una biblioteca espectral de FTIR en base a los análisis realizados.
4. Emplear la biblioteca espectral para la identificación de muestras biológicas.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos y soluciones

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica o superior, preparados con agua destilada miliRO. Para la síntesis de hidroxiapatitas se utilizó: hidróxido de calcio (Ca(OH)_2 , E. Merck), ácido fosfórico (H_3PO_4), urea ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, 99.3%, SIGMA), nitrato de calcio tetrahidratado ($\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 99%, Mallinckrodt), diamoniohidrogenofosfato ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 99.5%, Mallinckrodt), hidróxido de sodio (NaOH, 97%, Reagent SA. Laboratorios Cicarelli), fluoruro de sodio (NaF, 99.2%, J.T. Baker), nitrato de estroncio anhidro ($\text{Sr(NO}_3)_2$, donación del Departamento Estrella Campos de la Facultad de Química, UdelaR). Para la preparación de la solución de Fluido Biológico Simulado (SBF): cloruro de sodio (NaCl, 99.5%, Anedra), bicarbonato de sodio (NaHCO_3 , 99.5%, Mallinckrodt), cloruro de potasio (KCl, 99.5%, Merck), fosfato de potasio dibásico tetrahidratado ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 99.0%, J.T. Baker), cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 98%, J.T. Baker), cloruro de calcio (CaCl_2 , 95%, J.T. Baker), sulfato de sodio (Na_2SO_4 , 99%, Fluka), Tris-hidroximetil aminometano ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, 99.96%, Beijing Sbs

Genetech Co. Ltd.), ácido clorhídrico (concentrado, Mallinckrodt).

3.1.2 Equipos

Las medidas de difracción de rayos X (XRD) se realizaron en un difractómetro Philips PW3710 con radiación $\text{CuK}\alpha$ (sin corrección). Las muestras de las distintas hidroxiapatitas sintéticas fueron molidas a polvo en un mortero de ágata. Los espectros FTIR fueron obtenidos por un equipo IR Prestige-21 Shimadzu (Japón). Las muestras se prepararon en forma de pastillas utilizando una prensa hidráulica de mano Pike Crush IR™ Technologies, a una presión de 10 Ton. La microscopía de barrido electrónico se llevó a cabo en un equipo JEOL JSM-5900 LV (Japón), acoplado con un espectrómetro de dispersión de rayos X (SEM-EDS) con el que se midió la relación Ca/P de las apatitas.

3.2 Métodos

3.2.1 Síntesis de hidroxiapatitas nanoestructuradas

Se siguió la metodología empleada en el artículo de Kumar (Kumar *et al.* 2004) con leves modificaciones. Se preparó 250 mL de una solución de 0.2 M de Ca(OH)_2 a la cual se le agregó gota a gota 250 mL de una solución 0.12 M de H_3PO_4 , agitando por 2 h. En esta etapa, el pH de la solución fue de 5 y la temperatura de 52°C. La suspensión se la dejó reposar durante la noche (15 hs aproximadamente) a temperatura ambiente. El precipitado obtenido por centrifugación se lavó cuatro veces con agua miliRO, separando el sólido en cada tanda por centrifugación a 4000 rpm por 15 min. El precipitado obtenido fue secado en una estufa a 62°C durante la noche.

3.2.2 Síntesis de carboxiapatita tipo-B nanoestructurada

Se siguió la metodología empleada en el artículo de Wu (Wu *et al.* 2009) con algunas modificaciones. En primer lugar se calentó un volumen de 50 mL de solución de urea 2 M a 80 °C durante 22 hs. Se midió el pH a las 20 y 22 hs teniendo en ambos casos un valor de 8. En esta etapa de calentamiento se produce la disociación de la urea en NH_3 y CO_2 , y al mismo tiempo, debido al medio acuoso, el primero de estos se disocia en NH_4^+ y OH^- , mientras que el segundo se disuelve como CO_3^{2-} . El siguiente paso luego de la disociación de la urea es el agregado gota a gota de un volumen de 50 mL de una solución 0.5 M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Al final de este paso se midió el pH, siendo el mismo de 8. Sucesivamente se procede con el agregado de 50 mL de una solución 0.3 M de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ de forma lenta, gota a gota, mediante el uso de una bureta. Al final de este paso se vuelve a medir el pH obteniéndose un valor de 5. Ambos pasos se realizaron bajo condiciones de agitado constante y manteniendo la temperatura en el entorno de 80 °C. La solución final se dejó reposar 12 hs. El precipitado obtenido se lavó cuatro veces con agua miliRo, se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min entre lavado y lavado a modo de recuperar el precipitado. Finalmente al precipitado se secó en estufa a 60 °C durante 24 hs mínimo. Esta síntesis no dio los resultados esperados.

3.2.3 Síntesis de fluorhidroxiapatita

Se siguió la metodología empleada en el artículo de Manjubala (Manjubala *et al.* 2001), con algunas modificaciones. Se preparó una solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 M con un 5 % mol de F (mediante el agregado de NaF). A esta solución se la llevó a un pH de 9 con NaOH 2 M. Posteriormente a un volumen de 50 mL de la solución resultante,

se le agregó otro volumen de 50 mL de una solución 0.6 M de H_3PO_4 . Ésta se agregó de forma lenta y constante (2 mL min^{-1}), a temperatura ambiente y agitación constante durante todo el proceso. Finalizado este paso se midió su pH obteniéndose un valor de 2, por lo cual se ajusta nuevamente a pH 9 mediante el agregado de NaOH 2 M y se lo dejó a 80 °C durante 24 hs. Finalmente se lavó el precipitado cuatro veces con agua miliRo, centrifugando a 5000 rpm por 15 min entre cada tanda de lavado a modo de recuperar el precipitado. Este último finalmente se lo dejó secar a 90 °C por 48 hs.

3.2.4 Síntesis de estroncioapatita

Se siguió la metodología empleada en el artículo de Li (Li *et al.* 2007), con algunas modificaciones. Se preparó una solución 0.2 M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ conteniendo $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ en una relación molar Ca/Sr de 1,5 %, y otra solución 0.2 M de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Ambas se ajustaron a pH a 10 con solución de amonio al 25%. Posteriormente se agregó la solución de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ en la solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}/\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, de forma lenta y constante (1.36 mL min^{-1}). Este paso se realizó bajo agitación constante y temperatura de 50 °C. Se mantuvo la agitación y la temperatura constante por 5 hs luego de finalizado el agregado de solución. Se dejó reposar por 48 hs, y se lavó el precipitado obtenido tres veces con agua miliRo y un cuarto lavado con etanol absoluto. Entre cada tanda de lavado el producto fue recuperado como un *pellet* al centrifugarlo a 5000 rpm por 10 min. Finalmente el producto se secó a 120 °C en un horno durante 12 hs.

3.2.5 Muestras de apatitas biológicas

Se contó con dos muestras de apatitas biológicas. La primera de ellas consistió en una calcificación ósea del tendón del hombro, y fue obtenido por cirugía abierta (realizada por el Dr. Ivanier del CASMU y con consentimiento del paciente). La segunda muestra fue una pieza dental obtenida por un profesional odontólogo.

3.2.6 Preparación de apatitas sintéticas mufladas

Se tomó una porción de cada una de las apatitas sintetizadas (a excepción de la CA dado que su síntesis no fue exitosa) y se las llevó a 550 °C por 1 h en un horno de mufla. La muestra de depósito calcificado del tendón de hombro fue tratada a 550 °C durante 5 hs para eliminar toda impureza o rastro de materia orgánica.

3.2.7 Cálculo de los tamaños de cristalita en función del XRD

Se calcularon los tamaños de cristalita (D_{hkl}) de cada una de las apatitas sintetizadas y la HAc. Para ello se utilizó la ecuación de Scherrer ($D_{hkl} = K\lambda/(B_{hkl} \cdot \cos\Theta)$), tomando como K el valor aproximado de 0.94. El valor del ancho de medio pico (B_{hkl}) y el valor exacto de 2Θ se obtuvo mediante el ajuste de una función Lorentziana al plano 300, ubicado en el $2\Theta=33^\circ$, mediante el empleo del software Microcal Origin 7.0®, perteneciente a Microcal Software (Northampton, EE.UU). A partir de estos datos se obtuvo el $\cos\Theta$ y el B_{hkl} (el cual debió ser pasado a radianes para poder utilizar su valor en la ecuación). De esta forma se obtiene el D_{hkl} en Ångström y se lo pasa a nanómetros para mayor comodidad.

3.2.8 Preparación de las muestras para su caracterización por FTIR

Todas las muestras sintetizadas, tanto mufladas como no mufladas fueron caracterizadas por FTIR. Para ello cada una de las muestras por separado fue molida finamente mediante un mortero, y se mezcló dicho polvo con bromuro de potasio (KBr) en una proporción 1 a 3 respectivamente. Con la mezcla obtenida se fabricó una pastilla por aplicación de una presión de 10 ton durante 5 min. De esta forma se obtuvo una pastilla homogénea, transparente, y delgada, que al colocarse en un soporte adecuado fue utilizada para obtener el espectro FTIR de la muestra. Al espectro obtenido se le restó un *background* (o blanco), corrigiendo el espectro por la absorción del H₂O y CO₂ atmosférico, y obtenido con una pastilla conteniendo únicamente KBr.

3.2.9 Procedimiento de deconvolución gráfica de los espectros FTIR

Partiendo de la base de que los espectros obtenidos por FTIR están formados por bandas de absorción singulares solapadas debido a su ensanchamiento, se sometieron a un análisis por derivada y deconvolución gráfica, empleando el software Microcal Origin 7.0®, perteneciente a Microcal Software (Northampton, EE.UU). En primer lugar se seleccionó dos regiones del espectro correspondientes a las bandas del fosfato. La región 1, correspondiente al dominio ν_2 y ν_4 del fosfato (470 - 700 cm^{-1}) y la región 2, correspondiente a los dominios ν_1 y ν_3 del fosfato (800 - 1300 cm^{-1}). Mediante la deconvolución gráfica se intenta encontrar el número de onda de cada banda del fosfato para cada región, deconvolucionando cada curva en n componentes, al ajustar una serie de funciones lorentzianas mediante el algoritmo de Levenberg-Marquand. Para

ello fue necesario ingresar previamente al programa el número de bandas y la ubicación aproximada de cada máximo, lo cual se determinó mediante la derivada segunda y cuarta (mínimos y máximos de las derivadas respectivamente) de cada región del espectro, obteniendo como resultado la representación gráfica tanto de las curvas lorentzianas de cada componente como de la curva suma de todos los componentes, así como una tabla con los valores x-y de los máximos y el valor de χ^2 . Cada una de las curvas componentes se corresponde con un modo de vibración determinado. Este procedimiento se ilustra en la Figura 3.1 para la región ν_1 y ν_3 del fosfato. El mismo procedimiento se emplea para la región ν_4 (no se muestran datos).

Por tanto aplicando esta herramienta matemática en las regiones mencionadas, podemos identificar las señales generadas por los distintos modos de vibración del fosfato que al solaparse generan una banda compleja en el espectro. La calidad del proceso de deconvolución se siguió mediante el uso del parámetro (χ^2), el cual se mantuvo en el orden de 10^{-5} y 10^{-6} , indicando un excelente ajuste.

3.2.10 Cálculo de los índices de cristalinidad

Se calcularon tres índices de cristalinidad: el IRSF, la relación de absorbancias para las señales 1030/1020 y la relación 1060/1020. Para el cálculo del índice IRSF se utilizó la banda correspondiente al ν_2 y ν_4 del fosfato, tomando las distancias entre la línea de base (trazada entre los puntos 492 cm^{-1} y 750 cm^{-1}) y el máximo de las bandas 604 cm^{-1} y 565 cm^{-1} . Estas se utilizan en la siguiente relación: $SF=(A + B)/C$, donde A es la altura de la banda 604 cm^{-1} , B es la altura de la banda 565 cm^{-1} y C es la altura mínima del

valle entre ambas bandas. Para el cálculo de la relación 1030/1020 y 1060/1075 correspondientes a las bandas del ν_3 del fosfato, simplemente se utilizó la altura de cada banda mencionada en la relación, según una línea de base trazada entre 900 y 1200 cm^{-1} . Se ilustra el cálculo de los índices en la Figura 3.2.

3.2.11 Obtención de imágenes por el microscopio electrónico de barrido (SEM)

Cada una de las apatitas sintetizadas, hidroxiapatita, estroncioapatita, carboxiapatita y fluorhidroxiapatita, fueron observadas por el microscopio electrónico de barrido antes y después de ser mufileadas, bajo un voltaje de aceleración de 20 KeV. Para ello las muestras fueron medianamente molidas y adherida a un soporte metálico, de modo de evitar la pérdida de la muestra al someterla al vacío generado dentro del microscopio.

3.2.12 Obtención de la relación Ca/P por dispersión de rayos X (EDS)

Mediante la dispersión de rayos X, usando un sistema acoplado al SEM, se analizó la proporción de cada uno de los elementos que se requirió para cada una de las muestras sintetizadas sin mufilear. En todos los casos se analizó la relación Ca/P, al obtener los porcentajes relativos de los mismos en cada muestra.

3.2.13 Preparación de fluido biológico simulado (SBF)

Para la preparación de 100 mL de SBF se siguió estrictamente el protocolo de la página 174 del libro de Kokubo (Kokubo 2008). Inmediatamente después de llevar a

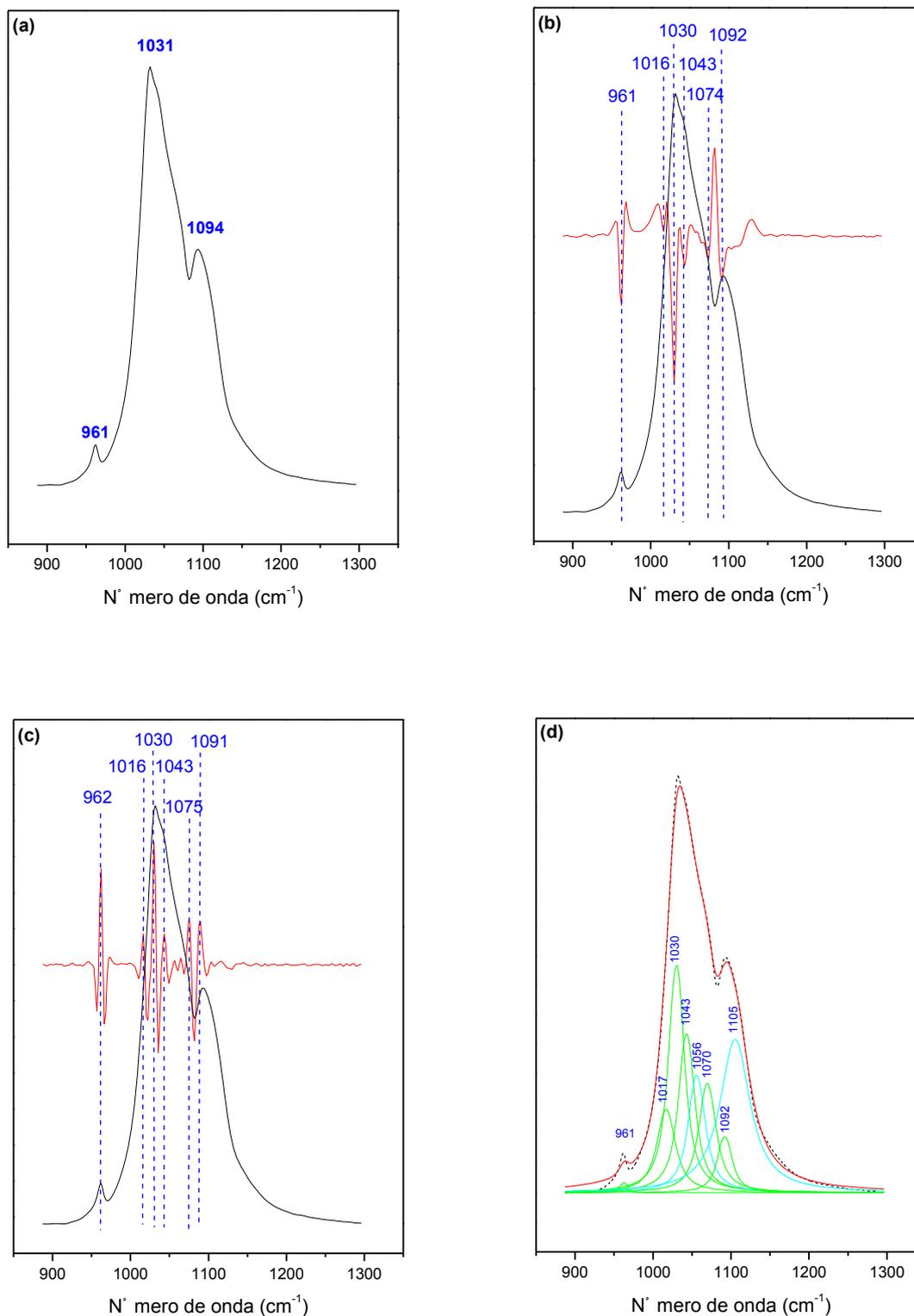


Figura 3.1. Procedimiento de espectrometría derivada y deconvolución gráfica del espectro de la hidroxiapatita comercial. En (a) se observa la región ν_1 y ν_3 del fosfato en donde se puede apreciar tres bandas de absorción claras, sumado a algún hombro que podría corresponder a más de una contribución. (b) Se muestra la derivada segunda de la región ya mencionada, en este caso tal herramienta permite distinguir 6 bandas que contribuyen a la formación de la región ν_1 y ν_3 , es decir las tres que ya veíamos a simple observación, más otras tres que no eran apreciables debido a que se encuentran solapadas entre sí (“ocultas”), contribuyendo a la formación del espectro. (c) Derivada cuarta de la región mencionada, la cual aunque resuelve bien los máximos, no aporta mayor información, ya que se siguen distinguiendo las mismas 6 bandas. (d) Deconvolución gráfica de la región ν_1 y ν_3 . Tomando como base las bandas encontradas por las derivadas, se deconvoluciona la región del espectro y se obtiene como resultado el número de bandas que componen esa región y su posición en el espectro. En este caso se observan 8 bandas, las 6 ya conocidas mediante la derivada y otras dos representada en color celeste.

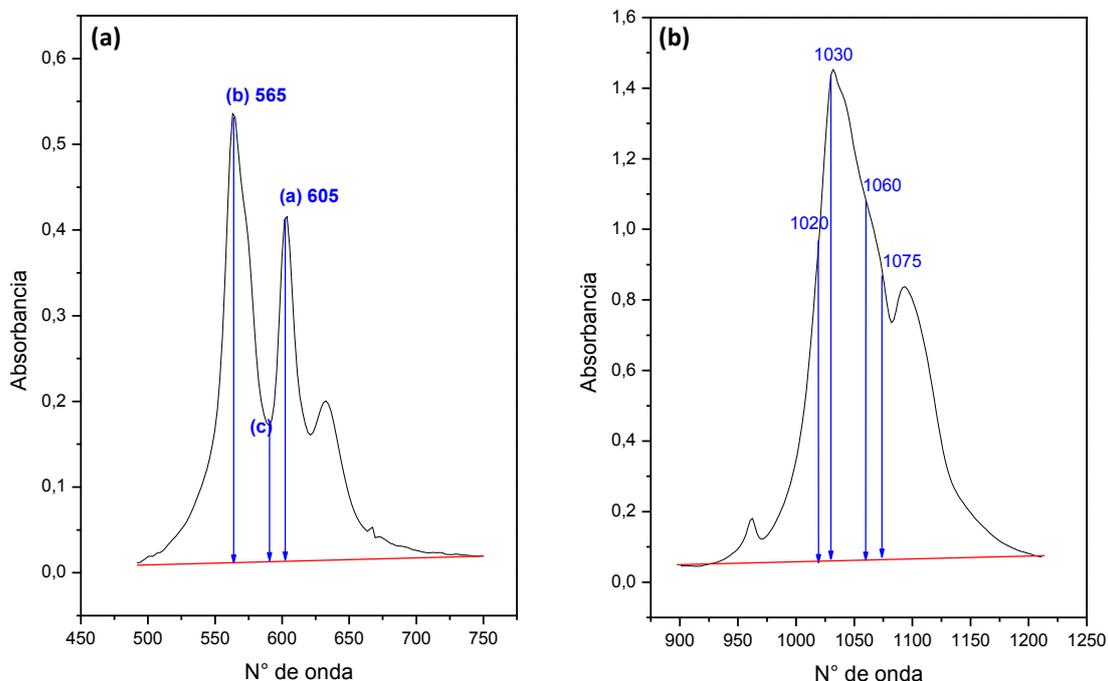


Figura 3.2. Ejemplo de cálculo de los índices de cristalinidad (SF , $1030/1020\text{ cm}^{-1}$ y $1060/1075\text{ cm}^{-1}$. (a) Región v4 del fosfato del espectro FTIR de HA, en el cual se muestran las alturas tomadas en función de la línea de base para calcular el SF según la siguiente fórmula: $SF = (a + b)/c$. (b) Se muestran los n° de onda para calcular las relaciones $1030/1020\text{ cm}^{-1}$ y $1060/1075\text{ cm}^{-1}$, las cuales fueron utilizadas como índices de cristalinidad. En ambos se marcan con flechas azules las distancias utilizadas entre las bandas y la línea de base (marcada entre 900 y 1200 cm^{-1}) para calcular cada uno de los índices de cristalinidad.

36.5 °C un volumen de 70 mL de agua destilada, se comenzó con el agregado de los reactivos, uno a uno, respetando el orden y las cantidades resumidas en la tabla A.1 del libro. Antes de agregar el Tris se corroboró el pH de la solución, siendo este de 1.59. La temperatura se reguló y mantuvo siempre en el entorno de los 36.5 ± 0.5 °C. El Tris se agregó lentamente hasta obtener un pH de 7.45, llegado a dicho punto se alternó el agregado de Tris con HCl 1.0 M de modo de mantener el pH entre 7.40 - 7.45. Este paso se completó una vez que se terminó de agregar la totalidad del Tris indicado por la Tabla, quedando el pH de la solución en 7.42. El mismo se trasvasó a un frasco de plástico nuevo, previamente lavado con agua destilada miliRo, y se almacenó en heladera a 4 °C.

3.2.14 Deposición de hidroxiapatita en placas de titanio sumergidas en SBF.

Se tomaron seis placas de titanio. Tres de estas placas consistieron en crecimientos nanotubulares de TiO_2^1 , con un área geométrica de 144 mm^2 para dos de estas y 54 mm^2 en la otra. De las otras tres restantes dos placas eran de titanio puro (> 99.8 %) de superficie lisa, y área de 162 mm^2 , obtenidas en la firma Goodfellow. Todas las placas mencionadas fueron sumergidas en SBF de forma vertical (Kokubo 2008), y en un volumen tal que se cumpla la siguiente proporción:

$$V_{\text{SBF}} = S_{\text{placa}}/10$$

donde V_{SBF} corresponde al volumen de SBF y S_{placa} al área superficial de la placa. Las placas

¹ Las muestras de chapas de titanio nanoestructuradas con TiO_2 fueron preparadas por Mariana Pereyra.

antes de ser colocadas en el SBF se irradiaron con luz UV y se montaron en el recipiente correspondiente de forma aséptica. A su vez el SBF fue autoclavado previo a su utilización. Una vez sumergidas las placas, se dejó en reposo por 31 días a 36 °C.

4 RESULTADOS

En la Sección 1.4 (pág. 17) se mencionaron los métodos más utilizados para caracterizar las apatitas, haciendo especial énfasis en las técnicas de XRD y FTIR. A su vez se explican sus características y la información que aporta su utilización. En este trabajo particularmente la técnica de XRD se aplicó para identificar las hidroxiapatitas como tales, y a una de sus variedades, la estroncioapatita; mientras que la técnica FTIR no solo nos permitió hacer la misma distinción, sino también la identificación del resto de las variedades, así como sus ambientes químicos.

4.1 Caracterización de apatitas sintéticas mediante XRD

La técnica de XRD fue utilizada en el presente trabajo con el propósito de corroborar que los productos de síntesis fueran los deseados, al comparar los espectros de cada muestra sintetizada con un estándar JCPDSHA correspondiente al espectro de la hidroxiapatita, Figura 4.1. Mediante la observación de tales espectros se puede apreciar que todas las apatitas sintetizadas coinciden con el patrón JCPDSHA, a excepción de la carboxiapatita. Esta última presenta un espectro muy distinto, con picos localizados en valores de 2θ de 26.6°, 29°, 30.5°, 40.8°, 42°, 43°, 45° y 59° que no se corresponden con ningún plano resaltado en el patrón de HA. A su vez

es notoria la ausencia de picos correspondientes a algunos de los planos más importantes del espectro de HA, como el 002 (25,8°), el plano 211 (31.8°), 112, (32.4°), 300 (33°), 310 (39.8°), 222 (46.6°), 213 (49.5°), 004 (53.3°), 323 (64°).

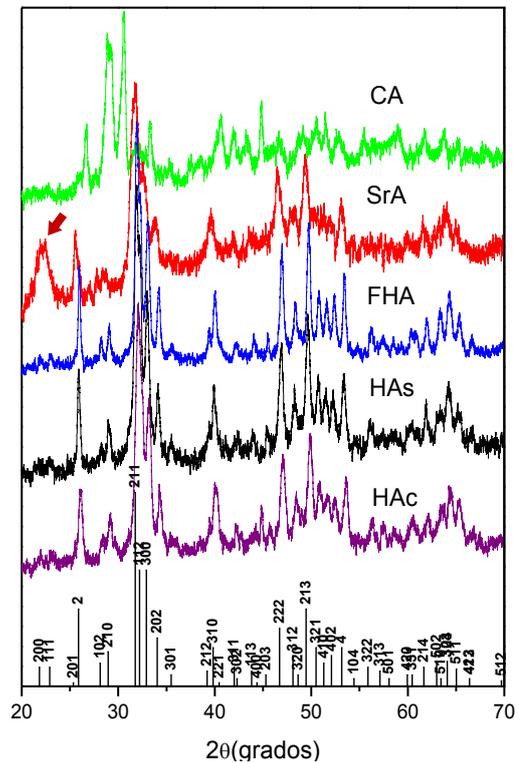


Figura 4.1. Espectros XRD. Se observan los patrones de XRD de la hidroxiapatita comercial Bio-Gel HTP (HAc) y las cuatro apatitas sintetizadas: hidroxiapatita (HAs), fluorhidroxiapatita (FHA), estroncioapatita (SrA) y carboxiapatita (CA). Todos coinciden con el patrón estándar de la hidroxiapatita salvo la carboxiapatita, cuyo patrón difiere significativamente. A su vez la SrA presenta una banda extra correspondiente a los planos 200 y 111 en un ángulo $2\theta=22^\circ$ (indicado con una flecha roja). Todos los espectros poseen la radiación $\text{CuK}\alpha$.

Al observar el espectro de la SrA (Figura 4.2), éste se corresponde exactamente con el de una HA, exceptuando una banda extra (marcada con una flecha roja) en el ángulo $2\theta=22,5^\circ$ correspondiente a los planos 200 y 111, causada por la distorsión estructural que genera la presencia del estroncio. Esta distorsión en el espectro ya se ha observado en los espectros de SrA de otro trabajo aunque no se hace mención a la misma (O'Donnell *et al.* 2008). Por otra parte se

pude apreciar un muy leve corrimiento de las bandas a valores de 2θ inferiores.

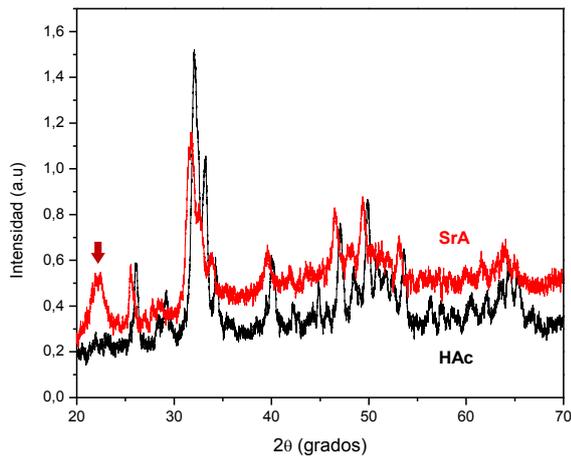


Figura 4.2. Comparación de los espectros XRD de la HAc y SrA. En la misma se observa con claridad un leve corrimiento del espectro de la SrA a la izquierda, así como una banda extra (marcada con una flecha roja) en un ángulo $2\theta=22^\circ$.

Por último se calcularon los tamaños promedio de cristalita de cada una de las apatitas sintetizadas y de la HAc (Tabla 4.1), mediante la aplicación de la ecuación de Scherrer para el plano 300 ubicado a $2\theta=33^\circ$. Observando la tabla podemos apreciar que los tamaños son coherentes entre sí y con lo reportado en la bibliografía para las hidroxiapatitas nanométricas (Li *et al.* 2005), exceptuando la HAc y la SrA que presentan valores inusualmente bajos.

Tabla 4.1. Tamaño de cristalitas (nm)	
HAc	5
HAs	23
FHA	18
SrA	4
CA	22

4.2 Caracterización de las apatitas sintéticas mediante FTIR.

4.2.1 Análisis de los patrones FTIR

Se mencionó en la introducción (Sección 1.4.3.2, pág. 24) las grandes ventajas que

presenta la técnica FTIR a la hora de identificar una especie química. En este trabajo dicha técnica no solo permitió corroborar la naturaleza de las especies químicas obtenidas durante la síntesis mediante sus patrones distintivos, sino que además se pudo conocer las sustituciones que presentan al identificar las bandas de los grupos funcionales.

En la Figura 4.3 se observan los espectros FTIR correspondientes a las muestras sintetizadas, las cuales se comparan con una hidroxiapatita comercial tomada como estándar. A su vez esta última se corroboró con el patrón JCPDSA mediante XRD, Figura 4.1. Todas las muestras presentan espectros

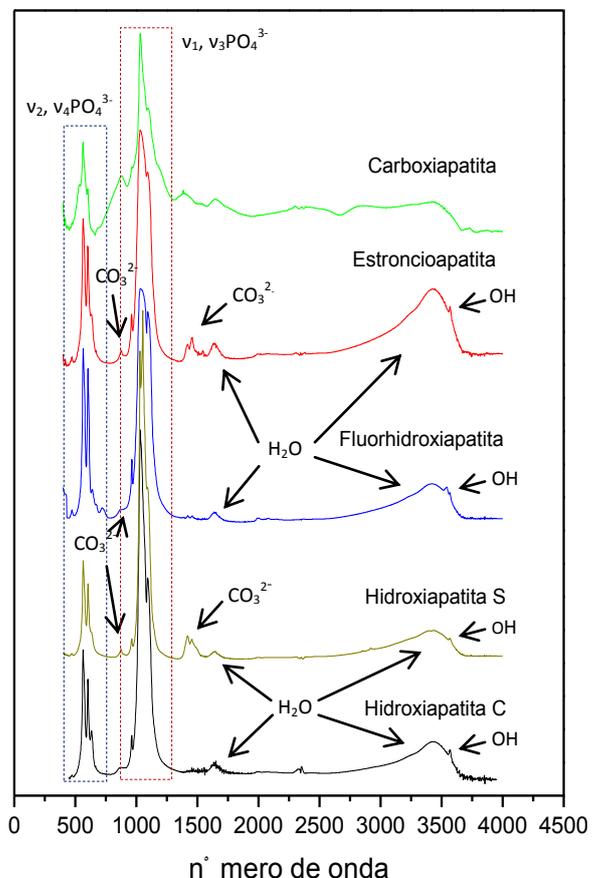


Figura 4.3. Espectros FTIR de cada una de las apatitas sintetizadas, hidroxiapatita, fluorhidroxiapatita, estroncioapatita, y carboxiapatita. Todas poseen el mismo patrón característico de las apatitas, salvo la carboxiapatita. Se marcan con flechas a que molécula o grupo de moléculas corresponde cada banda. El recuadro con líneas punteadas rojas y el de líneas punteadas azules, corresponden a los modos de vibración v_1, v_3 y v_2, v_4 del fosfato respectivamente. Se amplía la información en el texto.

FTIR con el mismo patrón y coinciden con la HA comercial, sin embargo la carboxiapatita presenta ligeras diferencias.

A su vez en estos espectros es posible identificar las bandas de absorción y correlacionarlas con las moléculas a las cuales corresponden. Por ejemplo se pueden reconocer las regiones del espectro correspondientes a los modos normales de vibración del fosfato, siendo estas ν_1 (962 cm^{-1}), ν_2 ($460\text{-}470\text{ cm}^{-1}$), ν_3 ($1006\text{-}1104\text{ cm}^{-1}$) y ν_4 ($560\text{-}603\text{ cm}^{-1}$). Otras bandas comunes en todos los espectros son las correspondientes a los modos de vibración del grupo OH (con un número de onda en el entorno de 630 cm^{-1} para la banda de libración y 3600 cm^{-1} para la banda de stretch) y H_2O (con número de onda en el entorno de 1600 cm^{-1} y $2800\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$). Todas estas bandas son características de las apatitas, y como se puede apreciar aparecen en todos los espectros de las muestras sintetizadas. Inclusive la fluorhidroxiapatita presenta ambas bandas del grupo OH, mostrando la banda de libración del OH un corrimiento a valores de número de onda mayores (de 632 cm^{-1} a 641 cm^{-1}), y una disminución en la absorbancia si se lo compara con la HAC, (Figura 4.4). En la parte (a) de esta figura se normalizó el espectro global de cada apatita y se enfocó la región $\nu_2\nu_4$ para poder analizar la contribución específica de la banda de libración del OH y así detectar la presencia o ausencia de flúor. Aunque la disminución de la absorbancia en principio parece pequeña, al relacionarla con las bandas del fosfato del $\nu_2\nu_4$ queda claro que la diferencia es importante, como se observa en la Figura 4.4 (b), en donde se normalizó específicamente la región $\nu_2\nu_4$ de cada apatita.

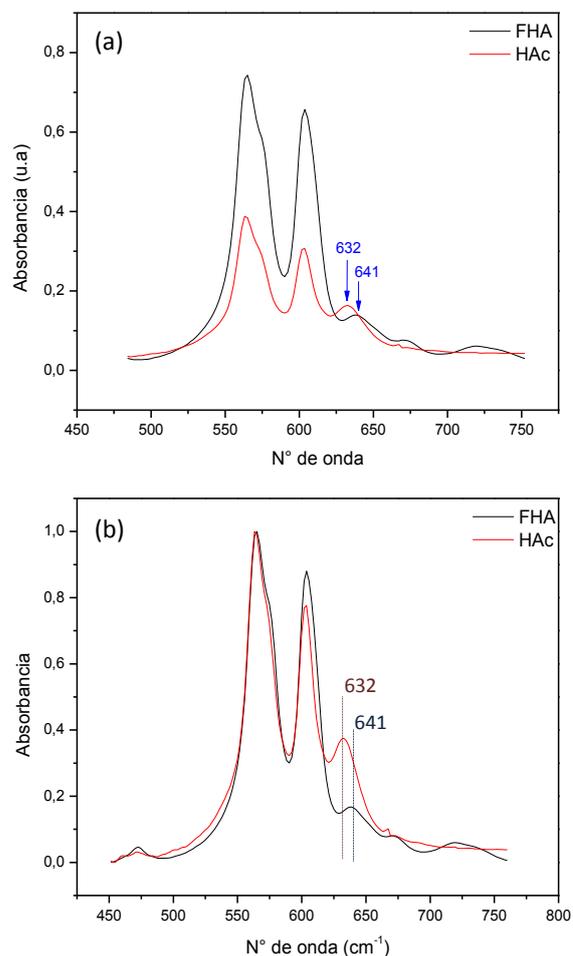


Figura 4.4. Comparación de la región $\nu_2\nu_4$ de la FHA y la HAC.

En (a) se muestra la región al normalizar los dos espectros en su totalidad de cada apatita. En (b) se muestra la misma región normalizada sin considerar al resto del espectro. En ambas se puede ver un corrimiento leve de la banda de hidratación constitutiva del cristal a un valor mayor de número de onda (de 632 cm^{-1} a 641 cm^{-1}), y una disminución significativa de la absorbancia de la misma banda.

Por otra parte, la carboxiapatita presenta las mismas bandas del fosfato y del H_2O propias de la HA, aunque con ciertas diferencias en su forma. A su vez la carboxiapatita, como es de esperar, presenta una banda intensa correspondiente al CO_3^{2-} tipo B en el número de onda 873 cm^{-1} y otra banda en el entorno de los 1400 cm^{-1} que también podría pertenecer al carbonato del tipo B, aunque está algo corrida del valor empírico habitual de 1420 y $1460\text{-}1470\text{ cm}^{-1}$.

Es interesante resaltar que la hidroxiapatita, la estroncioapatita y en menor proporción la fluorhidroxiapatita, presentan bandas claras correspondientes al CO_3^{2-} tanto del tipo A, como B, como no-apatítico, en los números de onda 871 cm^{-1} , 1429 cm^{-1} , y 1470 cm^{-1} para la HA y SrA, y 872 cm^{-1} , 1420 y 1457 cm^{-1} para la FHA. Estas bandas también se observan en los espectros de las muestras de tejido óseo y esmalte dental, como se aprecia en la Figura 4.5, en donde se puede observar que los espectros de las apatitas biológicas coinciden con el espectro de la HA sintética. Esta figura nos permite además observar la presencia de la banda de hidratación (agua constitutiva del mineral) en el entorno de $3000 - 3600\text{ cm}^{-1}$, la cual resulta ser sumamente amplia en la muestra de diente en comparación con el resto. En la Figura 4.6 se muestran los espectros

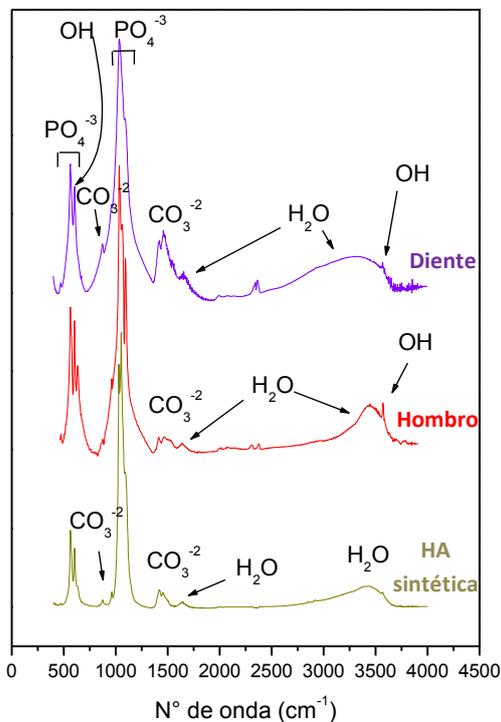


Figura 4.5. Comparación de los espectros FTIR de muestras biológicas con la hidroxiapatita sintética. Se muestran los espectros FTIR de la hidroxiapatita sintética sin tratar (HAs), de la apatita de calcificación de hombro, y de esmalte dental. Se puede ver que todas son hidroxiapatitas, particularmente las dos muestras biológicas corresponden a carboxiapatitas ya que presentan bandas de carbonato realmente notorias. En esta figura no son comparables las intensidades entre espectros dado que no están normalizadas.

normalizados (entre 0 y 1) mediante el Software Microcal Origin 7.0, de modo de poder comparar las intensidades de las bandas de absorción de las apatitas biológicas con respecto a las apatitas sintetizadas y a la HA comercial. En la misma se observa que la SrA presenta una intensa banda de hidratación, seguido por las apatitas biológicas, de hombro y diente respectivamente. Por último la HA comercial tratada térmicamente (HAc 550) es la que presenta la menor banda de hidratación. Todas las muestras fueron secadas a $60-120^\circ\text{C}$ (según indicado en la literatura para cada síntesis) luego de ser sintetizadas y almacenadas en un desecador, por lo que la hidratación observada es principalmente constitutiva del cristal.

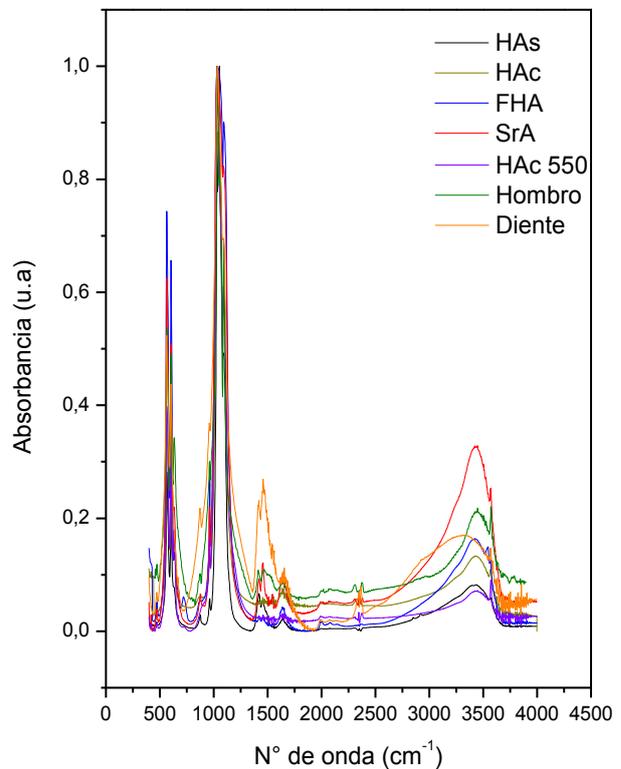


Figura 4.6. Espectros FTIR normalizados de las siguientes apatitas: hidroxiapatita comercial (tratada y no tratada térmicamente), apatitas sintetizadas (hidroxiapatita, fluorhidroxiapatita, estroncioapatita), y apatitas biológicas (apatita de esmalte dental, y apatita de calcificación de la articulación del hombro).

Por otra parte a excepción de la HAc térmicamente tratada y no tratada, el resto de las apatitas presentan bandas

correspondientes al carbonato, siendo en el caso de la apatita de diente la que presenta la banda más intensa. La FHA presenta una banda de carbonato muy tenue la cual se amplía para poder observarla en la Figura 4.7.

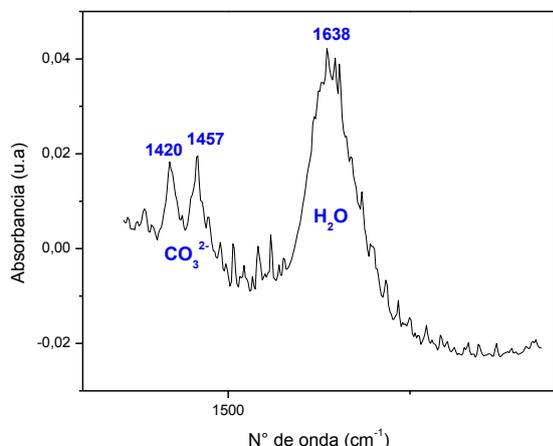


Figura 4.7. Espectro FTIR de la región de 1300 a 1950 cm^{-1} de la Fluorhidroxiapatita. En la misma se muestran las bandas de absorción del carbonato a 1420 y 1457 cm^{-1} correspondientes a carbonato tipo A + B y carbonato tipo B + no-apatítico respectivamente. También es apreciable una de las bandas de absorción del agua constitutiva del cristal con un número de onda de 1638 cm^{-1} .

Se puede observar un detalle interesante en la Figura 4.6, correspondiente a la banda del grupo OH, ésta es más intensa y marcada en la muestra de hombro y de HAC 550 que en el resto de las muestras. A su vez esta banda se aprecia en la HAC, HAs, FHA y SrA ya sean térmicamente tratadas a 550° durante 1 hora o sin tratar. Particularmente las muestras tratadas presentan una mayor agudeza e intensidad de esa banda, como se muestra en la Figura 4.8 al normalizar los espectros. Esto va acompañado, para el caso de la HAC y la SrA, con una disminución de la banda de hidratación. No se analizó la CA dado que sus síntesis no fue exitosa.

4.2.2 Análisis por deconvolución gráfica de espectros FTIR

A los espectros obtenidos por FTIR se les realizó un análisis por espectrometría derivada y deconvolución gráfica. Se explica

detalladamente el procedimiento seguido en la Sección 3.2.9 (pág. 31). Durante el cálculo de las derivadas se observó que en la mayoría de los casos alcanzó con la derivada segunda para conocer las bandas que componen el espectro, se muestra un ejemplo en la Tabla 4.2. En la Figura 4.9 se muestra el resultado de la deconvolución del espectro de la HA sintetizada, observándose el ajuste de bandas a las regiones $\nu_1\nu_3$ y ν_4 del fosfato, en el cual a cada uno de sus modos de vibración se los correlaciona con una función lorentziana según su posición. Dentro de las bandas del fosfato se resalta en rosado las bandas correspondientes al HPO_4^{2-} , debido a que es una molécula característica de los ambientes no-apatíticos.

Tabla 4.2. N° de onda de la banda ν_3 del fosfato de la HAC			
Espectro	2da. Derivada	4ta. Derivada	Deconvolución
-	1016	1016	1017
1031	1030	1030	1030
-	1043	1043	1043
-	-	-	1056
-	1074	1075	1070
1094	1091	1091	1092
-	-	-	1105

Con los números de onda obtenidos por este procedimiento se confeccionó la Tabla 4.3, en donde se presentan sus respectivas asignaciones a un modo vibracional específico. Estas asignaciones se encuentran en la primer columna, en las siguientes dos columnas se encuentran los números de onda esperados para las apatitas cristalinas y nanoestructuradas, y en el resto de las columnas se encuentran las muestras sintetizadas y las muestras biológicas. Esta tabla además de ser organizativa, pretende comparar las muestras sintetizadas con las biológicas, y encontrar coincidencias entre todas estas y las apatitas cristalinas o nanoestructuradas. De esta manera, al

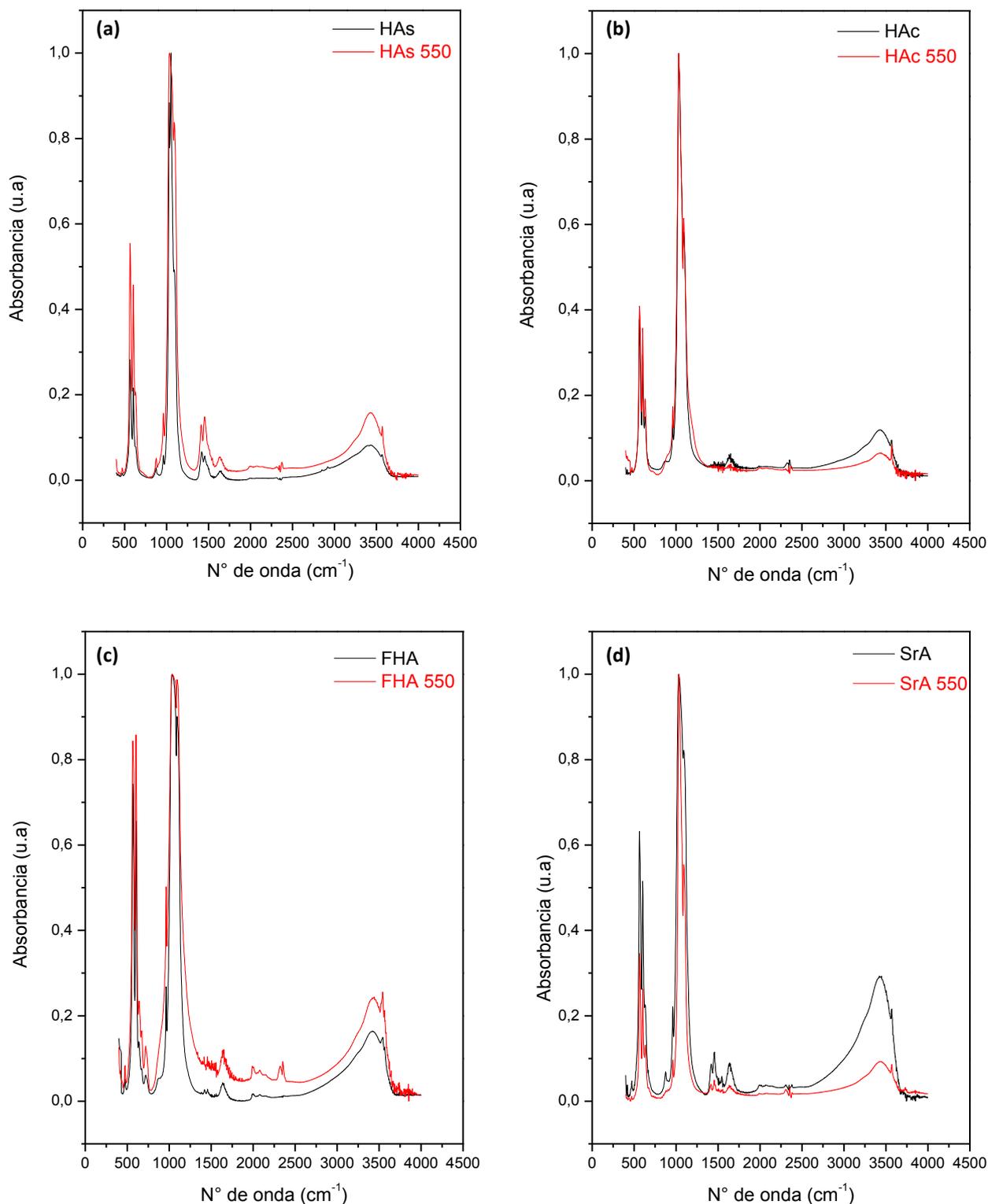


Figura 4.8. Comparación de los espectros FTIR normalizados de la HAc, HAs, FHA y SrA, con sus pares tratados térmicamente a 550°C por 1 hora. Como puede observarse no hay variación de los patrones del espectro, habiendo variaciones en las intensidades de algunas bandas. Particularmente es interesante destacar el incremento de intensidad y agudeza de la banda del grupo OH en todas las apatitas tratadas térmicamente. Si bien el incremento es leve, se lo puede relacionar en principio con un aumento en la cristalinidad de las muestras.

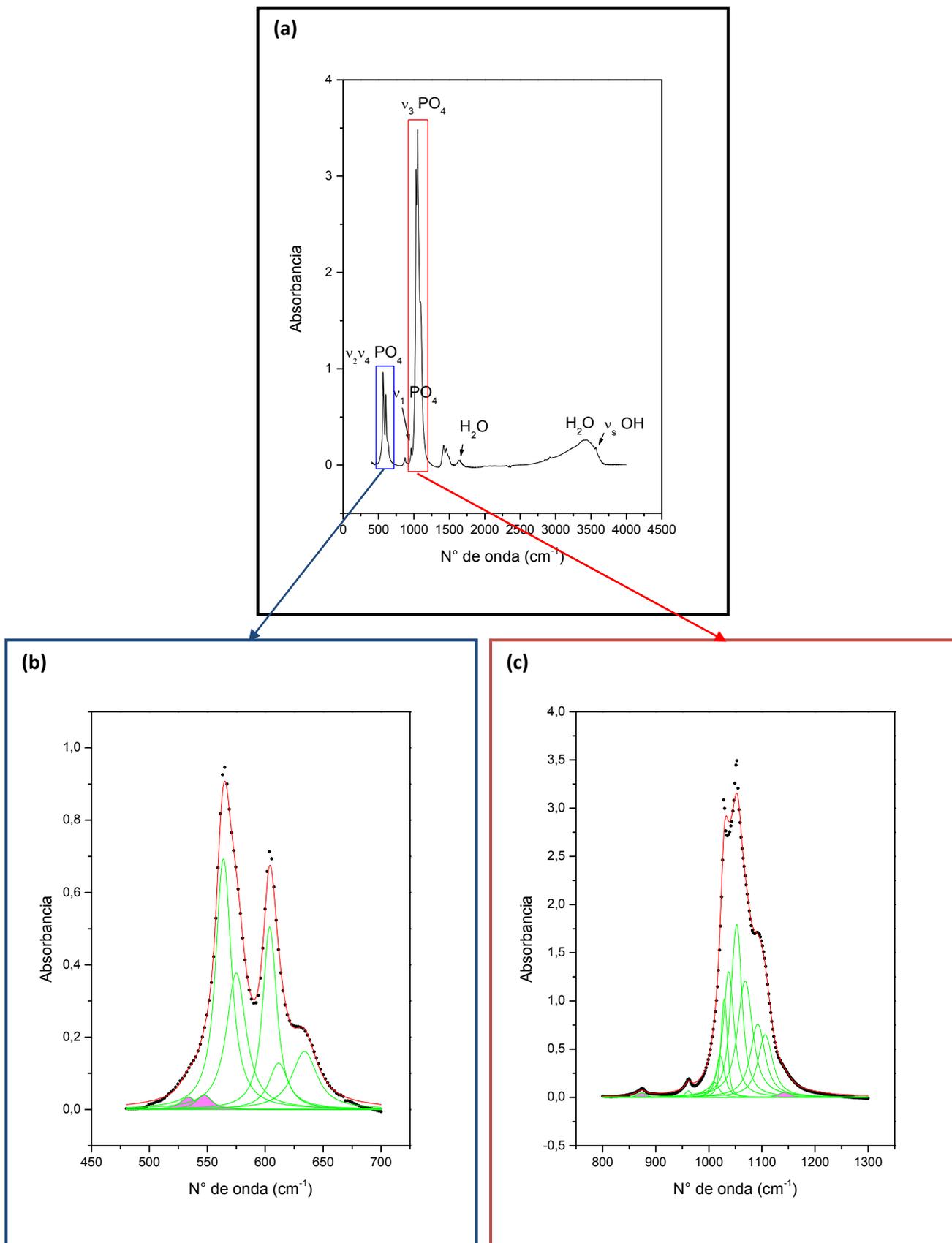


Figura 4.9. Deconvolución gráfica de las regiones del fosfato de la hidroxiapatita sintética. En (a) se muestra el espectro FTIR completo de la hidroxiapatita sintética. En (b) se observa la deconvolución gráfica de la región ν_2 y ν_4 del PO_4^- , y en (c) la deconvolución gráfica de la región ν_1 y ν_3 del mismo. En ambos casos se indican en verde las funciones lorentzianas correspondientes a los componentes de las regiones, mientras que en rojo se indica la curva suma de todas las contribuciones, la cual ajusta al espectro FTIR (representado en puntos negros). Cada función lorentziana corresponden a las bandas de absorción de los distintos modos de vibración del PO_4^- que no eran observables en el espectro original. Las bandas pintadas en rosado corresponden a los modos de vibración del HPO_4^{2-} .

Tabla 4.3. N° de onda (cm⁻¹) obtenidos por deconvolución gráfica

Asignación	Apatita estequiométrica*	Apatita nano-estructurada*	HA	FHA	SrA	Diente	Hombro
v ₂ PO ₄ ³⁻	464	469	472	472	472	468	472
v ₂ PO ₄ ³⁻	474						
HPO ₄ no ap		533	534		543	531	
HPO ₄ ap		551	547	542		548	545
v ₄ PO ₄ ³⁻	567	562	564	564	564	562	564
v ₄ PO ₄ ³⁻	572	575	575	576	574	575	576
v ₄ PO ₄ ³⁻	603	603	604	602	603	604	603
PO ₄ ³⁻ no ap		617	612	609			
v ₁ OH ⁻	633	633	633	642	633	630	635
no ap		866					
HPO ₄ ⁼		870				869	
v ₂ CO ₃ ⁼ B		871	873	872	874		
v ₂ CO ₃ ⁼ A		880			879		
v ₁ PO ₄ ³⁻	964	962	961	962	961	952	958
v ₃ PO ₄ ³⁻		1006	1010	1005	1006	1004	1001
v ₃ PO ₄ ³⁻		1020	1022	1023	1022		
v ₃ PO ₄ ³⁻	1026	1031	1029	1032	1032	1032	1034
v ₃ PO ₄ ³⁻	1034						
v ₃ PO ₄ ³⁻	1044	1044	1037	1043	1043	1053	1049
v ₃ PO ₄ ³⁻		1059	1052	1059	1056	1060	1063
v ₃ PO ₄ ³⁻	1063						
v ₃ PO ₄ ³⁻	1089	1072	1068	1074	1070		1071
v ₃ PO ₄ ³⁻		1091	1092	1094	1092	1098	1095
v ₃ PO ₄ ³⁻		1104	1106		1107		
?				1112			
HPO ₄ ⁼		1144	1143	1149		1153	1139

* Adaptados de Eichert Ref (Eichert *et al.* 2009).

observar las muestras sintetizadas, es posible ver que además de presentar los números de onda característicos de las bandas del fosfato del ambiente apatítico, común a todas las apatitas sean cristalinas o no, también presentan bandas extra correspondientes a ambientes no-apatíticos del fosfato, y al ion HPO_4^{2-} . Lo mismo se observa en las muestras biológicas, y como se puede apreciar en la columna 3 de la Tabla 4.3, es una particularidad que presentan únicamente las apatitas nanoestructuradas.

A su vez los números de onda de las bandas no-apatíticas se resaltan en color rojo a modo de facilitar su identificación, entre las cuales se observa además una banda debida a un HPO_4^{2-} correspondiente a un ambiente apatítico, el cual si bien no se encuentra en un ambiente no-apatítico, su presencia en un ambiente apatítico indica que debió ser incorporado al mismo desde una estructura no-apatítica durante el crecimiento del cristal, por lo que es un indicador más de la presencia de tal ambiente. Al observar las apatitas sintéticas, se ve que la HA presenta todas las bandas propias del ambiente no-apatítico del fosfato, así como también las bandas asociadas al HPO_4^{2-} , mientras que esta última aparece en menor medida en la FHA y SrA. Pasando al caso de las apatitas biológicas, se observa que el esmalte dental presenta más bandas relacionadas al ambiente no-apatítico que la muestra de hombro.

Por otra parte se compararon los resultados de la deconvolución de las muestras sintetizadas con sus pares tratados térmicamente, confeccionando para ello la Tabla 4.4. En la misma se ve claramente que no hubo mayores diferencias después del tratamiento, con la excepción de la HA en el cual se dejan de observar las bandas del HPO_4^{2-} .

4.2.3 Cálculo de los índices de cristalinidad

Se calcularon tres índices de cristalinidad, uno en base a la banda ν_4 del espectro FTIR del fosfato, conocido como *Splitting Factor* (SF), y dos basados en las bandas del ν_3 del fosfato, calculados mediante la relación 1030/1020 y 1060/1075, según lo explicado en la Sección 3.2.9. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.5, en donde se observa en primer lugar los índices de cristalinidad de la HAC, seguido de las apatitas sintetizadas, luego las biológicas y por último las tratadas. Si se comparan los valores de las apatitas sintetizadas con la HAC (la cual se toma como referencia) se puede ver que no presentan variaciones importantes para ninguno de los tres índices. Es llamativo que los valores de las relaciones 1030/1020 y 1060/1075 sean en el caso de la HAs levemente superiores que los de la HAC, mientras que el valor de SF es insignificamente menor. Lo mismo ocurre al comparar los valores de los índices de las muestras tratadas entre sí y con las muestras no tratadas, observándose que no varían en gran proporción. La HAC también se trató térmicamente (HAC 500) sin obtener variaciones en los índices. Por último es posible apreciar que los índices de las muestras biológicas son semejantes entre sí y se encuentran dentro de los valores observados para las apatitas sintetizadas.

4.3 Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido acoplada a un Espectrómetro de Dispersión de rayos X (SEM-EDS)

Se tomaron imágenes mediante el microscopio electrónico de barrido (SEM) de las apatitas sintetizadas con y sin posterior

Tabla 4.4. Comparación de los números de onda obtenidos por deconvolución de las apatitas con y sin tratamiento térmico.

Asignación	Apatita estequiometrica*	Apatita nano-estructurada*	HA	HA 550	FHA	FA 550	SrA	SrA 550
$v_2 PO_4^{3-}$	464	469	472	472	472	472	472	470
$v_2 PO_4^{3-}$	474							
HPO₄ no ap		533	534				543	536
HPO₄ ap		551	547		542	548		
$v_4 PO_4^{3-}$	567	562	564	564	564	564	564	564
$v_4 PO_4^{3-}$	572	575	575	575	576	576	574	574
$v_4 PO_4^{3-}$	603	603	604	604	602	602	603	603
PO₄³⁻ no ap		617	612		609	609		
$v_L OH^-$	633	633	633	632	642	643	633	633
no ap		866						
HPO₄⁼		870						
$v_2 CO_3^{=} B$		871	873	875			874	
$v_2 CO_3^{=} A$		880					879	
$v_1 PO_4^{3-}$	964	962	961	961	962	962	961	961
$v_3 PO_4^{3-}$		1006	1010	1009	1005	1006	1012	
$v_3 PO_4^{3-}$		1020	1022	1023	1023	1021	1024	
$v_3 PO_4^{3-}$	1026	1031	1029	1032	1032	1033	1032	1030
$v_3 PO_4^{3-}$	1034							
$v_3 PO_4^{3-}$	1044	1044	1037	1043	1043	1046	1042	1044
$v_3 PO_4^{3-}$		1059	1052	1056	1059	1060	1053	1058
$v_3 PO_4^{3-}$	1063							
$v_3 PO_4^{3-}$	1089	1072	1068	1070	1074	1073	1069	1071
$v_3 PO_4^{3-}$		1091	1092	1091	1094	1094	1093	1091
$v_3 PO_4^{3-}$		1104	1106	1103			1108	1102
?					1112	1114		
HPO₄⁼		1144	1143		1149	1147	1142	

* Adaptado del trabajo de Eichert Ref. (Farlay et al. 2010).

Tabla 4.5. Índices de cristalinidad v3 PO4			
Muestra	Relación 1030/1020	Relación 1060/1075	SF
HAc	1,51	1,23	5,7
HAs	2,06	1,39	5,4
FHA	1,10	1,09	6,4
SrA	1,11	1,08	5,9
Diente	1,22	1,21	5,4
Hombro	1,68	1,46	5,2
HAc 550	1,37	1,26	5,1
HAs 550	1,24	1,10	5,0
FA 550	1,05	1,03	4,5
SrA 550	2,04	1,35	6,5

tratamiento térmico a 550 °C. En las mismas se pudo observar una formación en agujas y gránulos en las apatitas térmicamente tratadas. Estas formaciones presentan tamaños 500 nm a 1 µm, tamaños sub-micrométricos pero no nanométricos, por lo que no pudo observarse estructuras nanométricas con esta técnica, Figura 4.10.

Otro análisis que se realizó a modo de complementar la caracterización fue la espectroscopia de dispersión de rayos X. En el cual se obtuvo las proporciones, en términos de porcentajes relativos, de Ca y de P de cada apatita sintetizada ya sea tratada como no tratada a 550°C, y de las apatitas biológicas de esmalte dental y de hombro. Esto se muestra en la Tabla 4.6. La primera muestra de cada grupo corresponde a la HA comercial, la cual se considera como control

Tabla 4.6. Valores de la relación Ca/P obtenidos por EDS					
Muestras sin tratar			Muestras tratadas (550°C)		
Muestra	Ca/P	(Ca/P)/1,67	Muestra	Ca/P	(Ca/P)/1,67
HA comercial	1,33	0,80	HA comercial	1,44	0,86
HA sintética	1,35	0,81	HA sintética	1,85	1,11
FHA	1,38	0,83	FHA	1,27	0,76
SrA	1,33	0,80	SrA	1,44	0,86
CA	1,13	0,68	CA	1,22	0,73
Diente	1,7	1,02	Hombro	1,56	0,93

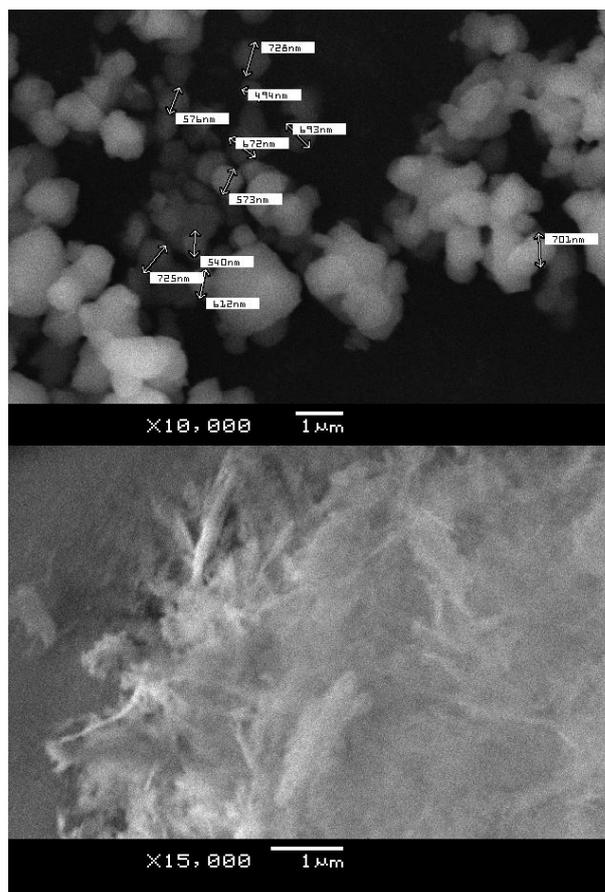


Figura 4.10. Imágenes obtenidas por el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). (a) Imagen de SEM de la FA tratada térmicamente, en donde se observan gránulos de entre 470 a 720 nm aproximadamente como muestran las etiquetas. (b) Imagen de SEM de la HA térmicamente tratada en donde se observan las formaciones en aguja.

o estándar siendo su valor de relación Ca/P de 1.33 y 1.44 para la HAc tratada y no tratada respectivamente, en contraste con el valor teórico de la relación Ca/P para la hidroxiapatita que es de 1,67. Todas estas apatitas caen dentro del rango aceptable para las apatitas sustituidas (1,30 a 1,80), siendo las apatitas biológicas las que presentan valores más cercanos al valor de la relación Ca/P teórico (esmalte dental con 1,7 y hombro con 1,56). Esto último se muestra de forma aun más clara en la tabla mediante la relación (Ca/P) de 1,67. Al observar en su totalidad la tabla se puede apreciar que las apatitas sintetizadas presentan una relación Ca/P que cae en un intervalo de 1.13 a 1.85. La carboxiapatita presenta valores de Ca/P inusualmente

bajos, de 1.13 y 1.22 sin y con tratamiento térmico, respectivamente. Por el contrario, la FHA disminuye su relación Ca/P de 1.38 a 1.27, luego del tratamiento térmico. La HAS presenta una relación Ca/P de 1.35, un valor muy similar a la HAC, cuando ambas no están tratadas, sin embargo al realizarles el tratamiento térmico la HAS aumenta notoriamente su valor de Ca/P hasta 1.85.

4.4 Síntesis de apatitas sobre placas de titanio

Se ensayó de forma preliminar una síntesis de hidroxiapatitas sobre placas de titanio tanto lisas como nanoestructuradas, que consistió en sumergir las placas en un medio similar fisiológico (*simulated body fluid*, SBF) durante 1 mes a 36°C, de manera que se produjera la deposición espontánea de la HA. Se obtuvo como resultado del ensayo una deposición relativamente uniforme de una capa cristalina fácilmente distinguible con una lupa de mesa, la cual se raspó y analizó por FTIR para su comparación con la biblioteca diseñada. El espectro se muestra en la Figura 4.11, en donde se observa la presencia de numerosas bandas, entre las cuales se resalta la banda de absorción del fosfato. La misma se deconvolució

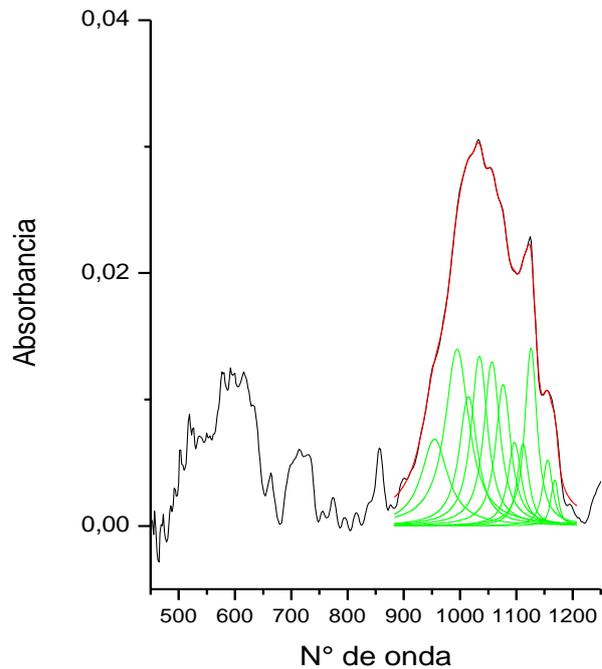


Figura 4.11. Espectro FTIR del depósito espontáneo sobre placas de titanio sumergidas en SBF. Se deconvolució la región del ν_1 y ν_3 del fosfato, la cual muestra entre otras, bandas correspondientes a una HA no-estequiométrica.

obteniéndose, entre otros, las bandas características de las hidroxiapatitas no estequiométricas (Tabla 4.7). En la misma se resalta en rojo la banda del fosfato ácido y el número de onda 1112 cm^{-1} que coincide exactamente con una banda no asignada que presenta exclusivamente la FHA.

Tabla 4.7. N° de onda de la banda de fosfato del depósito en placa						
Asignación	Apatita estequiométrica*	Apatita nano-estructurada*	HA	FHA	SrA	Depósito
$\nu_1\text{ PO}_4^{3-}$	964	962	961	962	961	955
$\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$		1006	1010	1005	1006	994
$\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$		1020	1022	1023	1022	1015
$\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$	1026	1031	1029	1032	1032	1034
$\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$	1034					
$\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$	1044	1044	1037	1043	1043	
$\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$		1059	1052	1059	1056	1057
$\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$	1063					
$\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$	1089	1072	1068	1074	1070	1077
$\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$		1091	1092	1094	1092	1097
$\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$		1104	1106		1107	
?				1112		1112
HPO_4^{2-}		1144	1143	1149		1156

*Apartado del trabajo de Eichert (Eichert *et al.* 2009).

5 DISCUSIÓN

En este trabajo se sintetizaron apatitas nanoestructuradas con diversas sustituciones, las cuales se caracterizaron mediante las técnicas XRD, SEM-EDS, y FTIR. Tanto la técnica de XRD como FTIR permitieron corroborar la naturaleza hidroxiapatítica de las muestras sintetizadas, ya que ambas técnicas generaron como resultado un espectro característico de cada muestra según: sus propiedades estructurales en el caso del XRD, y los grupos funcionales que conformen la molécula o cristal en el caso del FTIR. Mediante la observación de ambos espectros, se identificaron todas las muestras sintetizadas como “hidroxiapatitas”, a excepción de la “carboxiapatita” (conocida también como hidroxiapatita carbonatada). Esta última presenta algunas diferencias en su patrón de difracción de rayos X y espectro FTIR, que no se corresponden con los esperados para una hidroxiapatita con o sin carbonato, aunque sí presenta las bandas de absorción en infrarrojo del fosfato a los mismos números de onda que en las apatitas y con una

relación entre ellas muy similar, lo cual sugiere un compuesto conteniendo el grupo fosfato en un ambiente químico similar a la de las apatitas. En relación a esto, se ha reportado la posibilidad de obtener otros compuestos de ortofosfato de calcio durante la etapa de precipitación de la síntesis en medio acuoso de hidroxiapatitas, según las condiciones experimentales de pH y temperatura (Figura 5.1) (Eichert *et al.* 2009; León and Jansen 2009). En este trabajo se mantuvo constante la temperatura pero no el pH, siendo este último fijado al inicio pero variable a lo largo de la síntesis, por lo cual pudo ser un factor que afectara la síntesis de la CA, pese a que no afectó al resto de las apatitas sintetizadas. En valores de pH por debajo de 6.9 se obtiene un precipitado de fosfato de calcio amorfo deficiente en calcio (con una $Ca/P \approx 1,15$) que cambia rápidamente a dicalcificosfato (Dorozhkin 2010; Nasiri-Tabrizi and Fahami 2013). Durante la síntesis de la CA se llegó a valores de pH de 5, por lo que cabe la posibilidad de haber obtenido dicalcificosfato. A favor de esto la relación Ca/P de la carboxiapatita

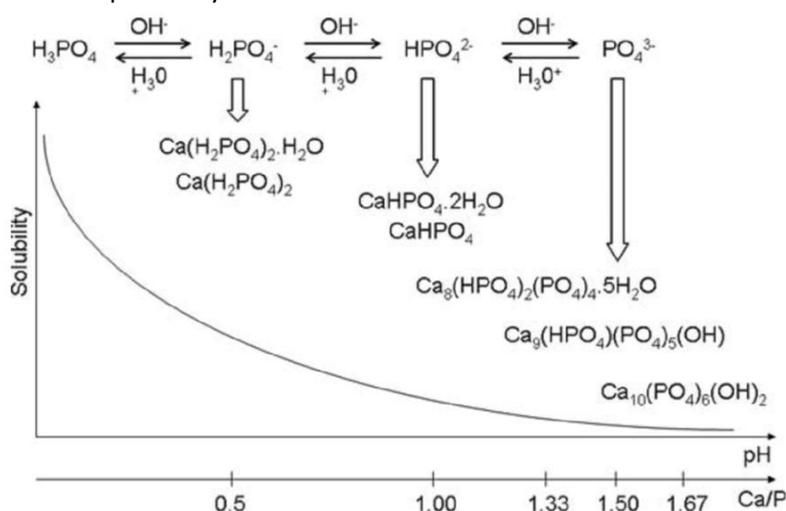


Figura 5.1. Formación de compuestos de ortofosfato de calcio según el pH. Se observa como a medida que se va alcalinizando el medio, y por tanto neutralizando el ácido fosfórico se puede obtener diversos compuestos fosfocálcicos. En paralelo se muestra la relación Ca/P que presenta cada uno de estos compuestos, y su solubilidad en medio acuoso, siendo decreciente hacia la derecha. En relación a esto último se observa que la hidroxiapatita es el más insoluble de los compuestos fosfocálcicos que pueden obtenerse mediante precipitación en medio acuoso (Hirota *et al.* 2012).

coincide con la relación reportada para el dicalciofosfato di-hidratado (brushite) (Tabla 4.6). Sin embargo cuando se comparan sus espectros XRD en la Figura 5.2 a y b, se observa que los patrones de difracción no se corresponden con el dicalciofosfato, tanto anhidro (monetite) como di-hidratado (brushite).

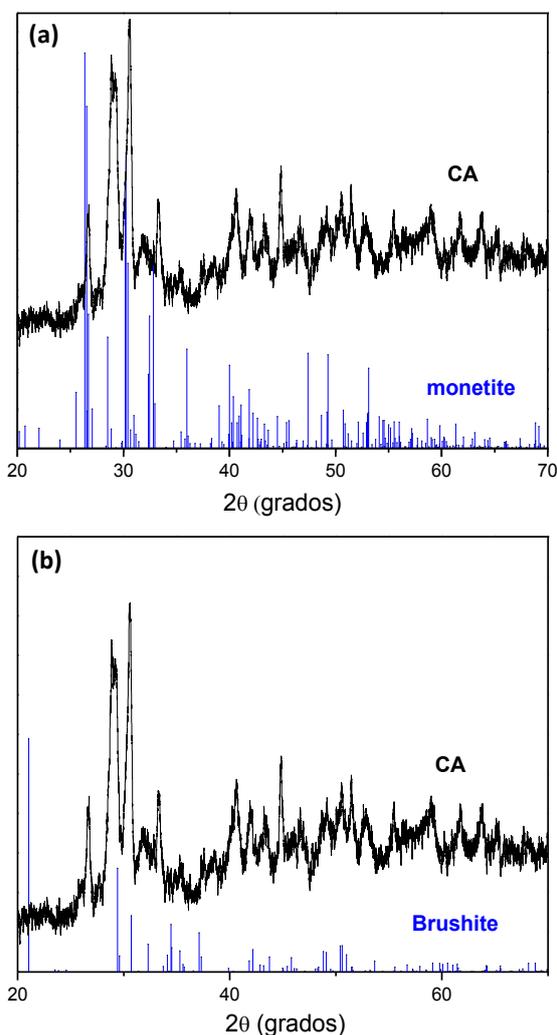


Figura 5.2. Comparación del espectro XRD de la CA con dos formas del dicalciofosfato. En (a) monetite y en (b) brushite. En ambos casos se observa que los espectros son diferentes. Los patrones XRD de la monetite y brushite fueron obtenidos de la base de datos del programa Match 2 de Crystal Impact (<http://crystalimpact.com/match/download.htm>).

Por otra parte es posible pensar en los precursores de HA como posibles productos de reacción, los cuales normalmente precipitan como primer fase cristalina, volviéndose posteriormente una fase cristalina termodinámicamente más estable

e insoluble como lo son las apatitas. Se hace mención a este fenómeno en la Sección 1.3.2 de la introducción. Según diversos autores se mencionan dos compuestos como precursores de la HA: el fosfato de calcio amorfo (ACP) y el octacalciofosfato (OCP) (León and Jansen 2009; Dorozhkin 2010). En la gran mayoría de los casos el ACP es la primera fase sólida que se obtiene de forma espontánea en una solución acuosa concentrada de calcio y fosfato a un pH mayor a 7 (Dorozhkin 2010). El mismo precipita como un gel inestable, que se torna rápidamente en ortofosfato de calcio de fase cristalina, normalmente OCP y una apatita. Dada la inestabilidad del ACP y del hecho de que el precipitado obtenido como CA se lo dejó madurar 12 hs no parece posible el haber obtenido ACP como principal producto de reacción. Sumado a esto el producto CA presenta un claro patrón XRD semejante al de la HA (Figura 5.2), muy diferente al patrón del ACP, el cual al ser un sólido amorfo (sin simetría) presenta un patrón de una o dos bandas de gran anchura en el entorno de 27°- 40° y/o 50°- 60° (Figura 5.3) (Eichert *et al.* 2009).

Por otra parte, el OCP es un intermediario usualmente encontrado en soluciones acuosas, e incluso se cree que es la fase inicial de las apatitas biológicas. Si bien es independiente del ACP, se ha observado como producto de la transición del ACP a una fase cristalina o incluso se lo menciona como precursor del compuesto amorfo (Liu *et al.* 2001). Sea del modo que sea es lógico pensar en el OCP como producto de la síntesis de CA, sin embargo el patrón de XRD obtenido no coincide con los patrones mostrados en la bibliografía para el mismo, Figura 5.4, por lo que quedaría descartado. Por último podría pensarse en otros compuestos fosfocálcicos relacionados de algún modo con la síntesis de

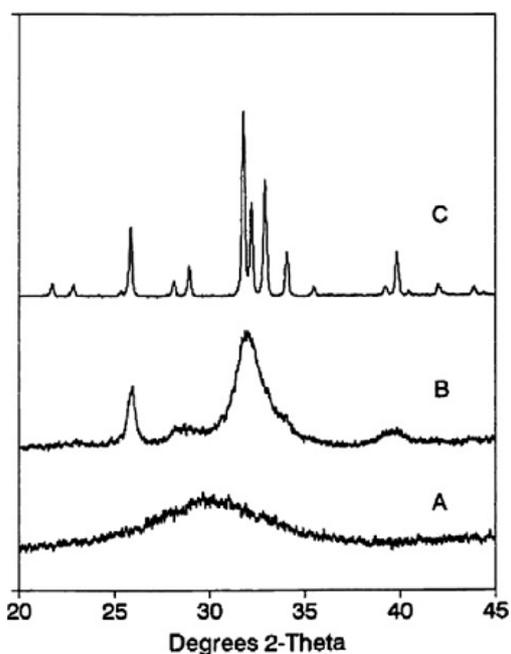


Figura 5.3. Fragmento de espectros XRD de: (A) Fosfato de calcio amorfo (ACP), (B) hidroxiapatita deficiente en calcio pobremente cristalina, (C) Hidroxiapatita estequimétrica altamente cristalina. Adaptado de Ref. (Kokubo 2008).

hidroxiapatitas, como el monocalciofosfato (MCP), el tricalciofosfato α y β (α y β -TCP), o el tetracalciofosfato (TTCP), los cuales mediante hidrólisis dan lugar a la formación de HA (Eichert *et al.* 2009). Sin embargo tanto el α -TCP, β -TCP, como el TTCP no pueden obtenerse por precipitación en solución acuosa, ya que requieren de altas temperaturas para ser sintetizados. Por otra parte el MCP si bien puede ser sintetizado en solución requiere de valores de pH menores a 4, condición que no fue alcanzada durante la síntesis de CA (Figura 5.1). Por tanto no queda claro cuál fue el producto de reacción obtenido mediante la síntesis de CA.

En cuanto al resto de las apatitas sintetizadas sí queda claro que son hidroxiapatitas, y en particular el espectro XRD de la SrA fue capaz de confirmar claramente la presencia de Sr como sustituto en su estructura. Esto es debido a dos variaciones en el espectro, una correspondiente a la presencia de un pico extra en el entorno de $2\theta = 22^\circ$, y la otra

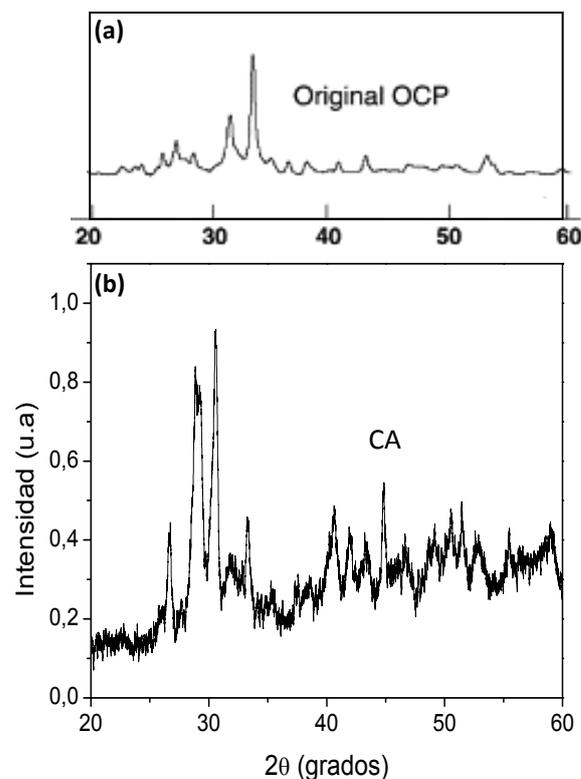


Figura 5.4. Fragmento de los espectros XRD del octacalciofosfato (a) y la carboxiapatita sintetizada (b). Se puede ver que los espectros son diferentes. El espectro XRD del OCP fue adaptado de Ref. (Suzuki *et al.* 2006).

correspondiente al corrimiento de los picos a valores de 2θ menores. Ambos efectos se deben a la distorsión estructural que genera la incorporación del Sr al cristal, particularmente el corrimiento de los picos es una consecuencia del radio atómico del Sr, el cual es superior al del Ca (0.219 nm y 0.194 nm respectivamente), y por tanto se ven potenciados los parámetros de celda, y el espaciamiento entre los átomos de Sr y sus contiguos (O'Donnell *et al.* 2008; Ozeki *et al.* 2013).

En cuanto a la FHA su identificación se realizó mediante su espectro FTIR (ya que su espectro XRD es idéntico al de una HA), observando en el mismo una disminución de la absorbancia de la banda de libración del OH, y un corrimiento de esta a valores mayores de números de onda. Según lo reportado en el trabajo de Manjubala (Manjubala *et al.* 2001), era esperable la

pérdida de la banda de libración del OH, debido a la sustitución del grupo OH por el anión flúor. En el caso de la FHA sintetizada no se ve una pérdida total de la banda, pero si se aprecia una alteración importante, por lo cual podría indicarse una sustitución parcial.

En relación a los espectros FTIR de las apatitas sintetizadas, es interesante destacar que la HA, SrA y FHA presentan bandas correspondientes al carbonato tanto tipo A, como B, como no apatítico, siendo este último un dato muy importante al ser un claro indicador de la presencia de un ambiente no-apatítico en cada una de esas muestras. La aparición del carbonato en todas las apatitas sintetizadas se explica por la absorción del CO₂ atmosférico durante la síntesis, fenómeno ya reportado anteriormente (Li *et al.* 2007). El mismo depende de la temperatura de la solución, como se ejemplifica en la Figura 5.5, y de la presión parcial del gas, como indica la ley de Henry:

$$C = K_H \cdot P_x$$

Siendo C la concentración del gas disuelto en el líquido, P_x la presión parcial del gas x, y K_H la constante de Henry, correspondiente al volumen de ese gas disuelto en un cm³ de líquido a condiciones de temperatura estándar

[http://www.ceset.unicamp.br/~mariaacm/S_T405/Lei%2520de%2520Henry.pdf].

Ambas síntesis se realizaron a temperatura constante del entorno de 50 °C y a presión atmosférica, lo cual indica que la solubilidad del CO₂ en esas condiciones, según la Figura 5.5, es de aproximadamente 0.75 g/L de solución. Una pequeña parte de este gas disuelto actúa como ácido de Lewis y se hidroliza en agua dando lugar a la formación

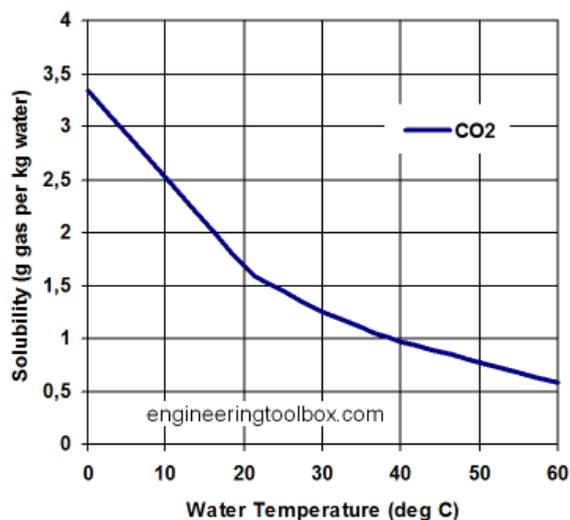


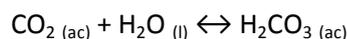
Figura 5.5. Solubilidad del dióxido de carbono (CO₂) en agua según su temperatura. Adaptado de http://www.engineeringtoolbox.com/gases-solubility-water-d_1148.html.

reversible de bicarbonato y protones, como se muestra en la Ecuación 1 [http://en.wikipedia.org/wiki/Carbon_dioxide]. Esta reacción tiene lugar en dos pasos, en primer lugar el CO₂ disuelto reacciona de forma reversible (estableciendo un equilibrio) con el agua dando como resultado ácido carbónico (Ecuación 2), el cual se disocia en bicarbonato y protones, disociándose a su vez el bicarbonato en carbonato y protones. Ambas reacciones de disociación corresponden a equilibrios ácido-base, las mismas se muestran en la Ecuación 3 y 4.

Ecuación 1:



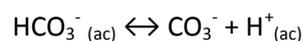
Ecuación 2:



Ecuación 3:



Ecuación 4:



Por tanto al ser un equilibrio ácido base y al liberar protones en varias etapas de la reacción, las concentraciones relativas de cada una de estas especies carbonatadas van a depender del pH de la solución, esto se ejemplifica en la Figura 5.6. Aplicando este concepto a las condiciones de síntesis, vemos que para el caso de la SrA, en el cual el pH de síntesis inicial fue de 10, se vio favorecida la formación de carbonato, dado que el consumo de los hidrogeniones libres desplaza el equilibrio hacia la formación del mismo (Ecuación 4). A su vez, durante la síntesis, la incorporación del carbonato al cristal de la estroncioapatita genera un mayor desplazamiento del equilibrio a favor del carbonato, quizás compensado por variaciones del pH. Por otra parte la síntesis de la HA se lleva a cabo en un medio neutro en principio, el cual se va acidificando, llegando a un valor final de pH 5. En este caso se vería favorecida la formación de bicarbonato y ácido carbónico en vez de carbonato, sin embargo sigue habiendo carbonato en solución, y su incorporación podría afectar el equilibrio a favor de la formación del mismo. Por otra parte las bandas del carbonato presentes en la FHA son muy tenues, correspondiéndose al carbonato tipo B a 872 cm^{-1} , tipo A+B a 1457 cm^{-1} y del tipo B + no apatítico a 1420 cm^{-1} . La síntesis comenzó en una solución de pH 9, por lo cual se veía favorecida la formación de carbonato, explicando su presencia en el cristal. Durante la síntesis hubo una caída del pH de la solución hasta un valor de 2, en el cual prácticamente la totalidad del CO_2 disuelto estaba como CO_2 (ac) y ácido carbónico, por lo que la concentración de carbonato fue decayendo junto con el pH. Es posible que esto haya disminuido la cantidad de carbonato incorporado al cristal de FHA durante su síntesis, y quizás se deba a ello la baja intensidad de las bandas del carbonato. Sin embargo no es posible afirmarlo ya que

no se cuenta con un análisis cuantitativo que lo avale.

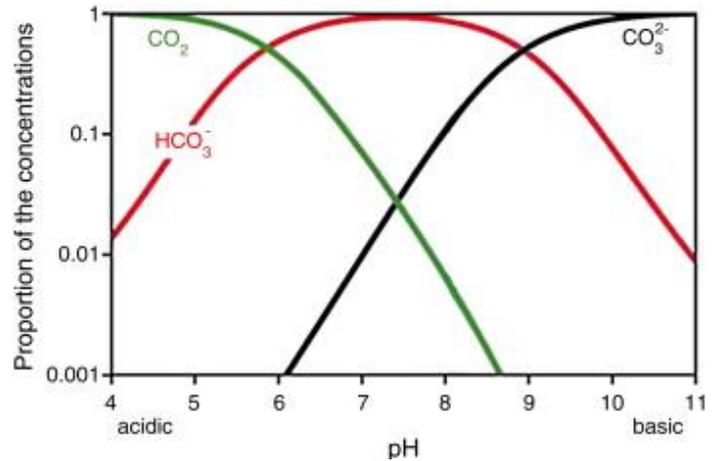


Figura 5.6. Porcentaje de distribución de las especies químicas del carbono inorgánico en función del pH, en una solución de fuerza iónica equivalente a 1.61 mol/L . Adaptado de Ref. (Waly *et al.* 2012).

Las bandas del carbonato en la HA y SrA se mantuvieron inalteradas luego de ser tratadas térmicamente, mientras que en la FHA tratada no es posible diferenciar la banda del carbonato del ruido, dado que esta banda es muy poco intensa en la FHA, sumado a que el ruido fue más intenso que en otras muestras. De todos modos no hay indicios de una pérdida o disminución del carbonato en ninguna de las muestras debido al tratamiento térmico, como sí se ha reportado en otro trabajo (Wu *et al.* 2009). Por otro lado, la banda del grupo OH correspondiente a una longitud de onda del entorno de 3567 cm^{-1} , sí se vio levemente afectada por el tratamiento mencionado, mostrando un incremento en la agudeza en todas las apatitas tratadas. Este fenómeno puede deberse a la disminución de la banda de hidratación (en el entorno de los 3450 cm^{-1}) haciendo más visible la banda del grupo OH, para el caso de la SrA, o inclusive en la HA comercial. Sin embargo esto no se aplica para la HA sintética, ni la FHA, ya que presentan un incremento de la intensidad de ambas bandas. La banda del OH está relacionada con la cristalinidad de la apatita, particularmente con el grado de orden de los

átomos (Pasteris *et al.* 2004), por tanto su incremento sugiere un aumento de la cristalinidad de éstas apatitas tratadas térmicamente. Sin embargo los índices de cristalinidad calculados no mostraron diferencias entre estos y sus pares no tratados, lo cual sugiere: o que el incremento de la intensidad de las bandas del OH no fue significativo, o que la temperatura utilizada no fue suficiente como para generar un cambio notable a través de los índices de cristalinidad. Siendo esto último coherente con los resultados obtenidos por Lebon (Lebon *et al.* 2010), el cual reporta un incremento significativo de tales índices de cristalinidad para apatitas biológicas tratadas térmicamente a 600°C o más. Se ha reportado que el SF está más relacionado al tamaño de cristal que a los cambios de orden de los ambientes moleculares, siendo este último de los primeros efectos observables durante los tratamientos térmicos. Además se ha corroborado una menor sensibilidad por parte de dicho índice para detectar cambios en el ambiente apatítico del fosfato en comparación con otros indicadores (Lebon *et al.* 2010). Por lo cual podría suponerse que el índice SF utilizado no es suficientemente sensible como para detectar posibles cambios en la cristalinidad de las apatitas tratadas a 550°C, particularmente si estos se relacionan a variaciones en el ordenamiento estructural de los ambientes. Sin embargo la relación 1030/1020 utilizada sí parece relacionarse con el ordenamiento estructural, ya que es una forma de comparar las proporciones de ambientes apatíticos y no-apatíticos, por lo cual está relacionado más al estado de maduración del cristal que al tamaño de cristalita (Farlay *et al.* 2010). De todos modos no mostró diferencias entre las muestras tratadas y no tratadas, por tanto según los índices empleados no habría cambios en la

cristalinidad de las muestras luego de ser tratadas térmicamente a 550 °C.

A su vez una forma de identificar si las apatitas sintetizadas son nanocristalinas, en base a la presencia de determinadas moléculas y sus ambientes químicos es por medio de la espectrometría derivada y deconvolución gráfica de los espectros FTIR, de la cual se mencionan sus bases en la Sección 1.4.3.2 (pág. 24) y se explica su aplicación en este trabajo en la Sección 3.2.9 de Materiales y Métodos (pág. 31). Esta herramienta matemática nos permite encontrar las bandas de absorción debidas a los modos vibracionales que no pueden distinguirse directamente por la simple observación de los espectros debido a que se encuentran solapadas contribuyendo al incremento del ancho de las bandas. Mediante esta metodología se pudo detectar los números de onda de las bandas del fosfato correspondientes tanto a ambientes apatíticos como no-apatíticos de todas las apatitas sintetizadas. A su vez se logró reconocer las bandas del HPO_4^{2-} , las cuales son muy importantes debido a que son indicadores de la presencia de un ambiente no-apatítico. Todo esto sumado a que ya se habían reconocido por observación directa del espectro las bandas del carbonato pertenecientes a ambientes no-apatíticos, sugiere que las mismas son nanocristalinas. Esto último además fue corroborado al calcular los tamaños promedio de cristalitas de cada una de las muestras sintetizadas y la HAc, siendo todas del orden de los nm.

En función de las apatitas sintetizadas, se compararon dos muestras biológicas (esmalte dental y calcificación de hombro) en las cuales se identificaron fácilmente los ambientes no-apatíticos, develando a su vez su naturaleza nanocristalina. En favor de esto, los índices de cristalinidad de ambas muestras fueron semejantes a los de las

apatitas sintetizadas (Tabla 4.5), los cuales en su conjunto son relativamente bajos en comparación con lo mencionado en la bibliografía (Weiner and Bar-Yosef 1990; Lebon *et al.* 2010). Además se observaron en ambos casos bandas sumamente importantes correspondientes al carbonato tanto del tipo A, B, como no-apatítico, por lo que serían carboxiapatitas del tipo A y B, lo cual se condice con lo reportado para los tejidos mineralizados ya que presentan una componente importante de carbonato tipo B, y en menor proporción de tipo A (Mathew and Takagi 2001). A su vez todas las apatitas sintetizadas, así como las apatitas biológicas presentan bandas correspondientes a moléculas de agua. La importancia de resaltar esta banda radica en que su presencia está relacionada al ambiente no-apatítico, ya que esas moléculas de agua son los remanentes de las moléculas que formaban la capa hidratada cuando los cristales se encontraban aún en medio acuoso (Eichert *et al.* 2002). Mientras los cristales están formando un gel, presentan una cantidad de moléculas de agua muy alta en relación a las que permanecen asociadas al cristal, por tanto gran parte de esas moléculas interaccionan entre sí, formando todas estas en su conjunto la capa hidratada. Una vez que son secadas las muestras pierden gran parte de esa hidratación, quedando solo las moléculas de agua que permanecen unidas al cristal mediante fuertes interacciones de hidrógeno, lo cual conlleva a su vez al colapso de la capa hidratada. Esto ocurrió con la muestra de hombro, que debió ser incinerada, así como con las apatitas sintetizadas, ya que debieron ser secadas en horno de calor seco a baja temperatura. De todos modos la presencia de las bandas de hidratación es una forma más de evidenciar la existencia del ambiente no-apatítico. El hecho de que las bandas de hidratación sean notoriamente

mayores en la muestra de esmalte que en el resto de las muestras, puede estar relacionado con el hecho de que el esmalte fue analizado mediante FTIR sin ser secado, es decir sin previo tratamiento térmico (al natural) y por tanto presentaría una hidratación mayor a la constitutiva del cristal (propio de una capa hidratada).

En relación a la topografía de las apatitas tanto sintetizadas como las biológicas, las imágenes obtenidas por SEM no fueron suficientemente nítidas debido a que las muestras no fueron metalizadas, por lo que sólo pudo observarse en las muestras térmicamente tratadas, estructuras en aguja (en HA y SrA) y de gránulos (en la FA), del orden de los 500 nm en adelante (sub-micrométricas). Ambos tipos de estructuras han sido reportados para las apatitas nanoestructuradas, en particular la formación en gránulos es muy interesante ya que se ha visto que se asemeja a las estructuras biológicas luego de ser calcinadas de modo de eliminar el material orgánico presente (ej: colágeno), lo cual deja una estructura de poros interconectados que estimula el crecimiento óseo (Giraldo-Betancur *et al.* 2013).

Los resultados para la relación Ca/P de las HA evaluadas en este trabajo muestran consistentemente un alejamiento del valor teórico de 1.67. No queda claro que estos valores sean realmente representativos de las muestras analizadas, o resulten de la técnica empleada. La rugosidad del material puede afectar la lectura por EDS (Bailey 2009), lo cual puede explicar los bajos valores obtenidos para la relación Ca/P.

Por último, a modo preliminar se ensayó la síntesis de HA sobre placas de titanio por inmersión de las mismas en SBF, en la cual se obtuvo una deposición relativamente uniforme a lo largo de la placa

especialmente en las placas nanoestructuradas. Es importante destacar que el ensayo tuvo algunas dificultades, en primer lugar la cantidad de muestra obtenida para analizar mediante el raspado de las placas fue muy poco, apenas alcanzó para realizar una pastilla. En segundo lugar el sistema empleado para sujetar y mantener sumergidas las placas se oxidó durante el proceso, comprometiendo el análisis. Si bien el espectro FTIR no presenta un patrón característico de las hidroxiapatitas, la deconvolución de la región ν_1 y ν_3 revela la existencia de las bandas de fosfato con números de onda característicos de las HA nanoestructuradas, resaltando la banda del fosfato ácido propio de un ambiente no-apatítico. Para las otras bandas que aparecen, es difícil asignarlas a la misma hidroxiapatita o a otros contaminantes generados durante la deposición espontánea, ya sean intermediarios de la síntesis de HA o contaminantes debidos a la oxidación parcial de la muestra. En sí es un resultado preliminar pero interesante, ya que alienta la posibilidad de intentar reproducir y mejorar este tipo de síntesis directa sobre placas.

6 CONCLUSIONES

El empleo de las apatitas sintetizadas en este trabajo como materiales de referencia permitió elaborar una biblioteca de espectros FT-IR que se puede emplear en la identificación de muestras biológicas, así como en la evaluación y control de nuevas rutas sintéticas. La síntesis de hidroxiapatitas dio como resultado la formación de carboxiapatitas nanoestructuradas. El éxito de estas síntesis, se debe no sólo a las condiciones de síntesis, sino al tiempo de maduración apropiado, el cual debe ser suficiente para que los posibles precursores maduren hacia la formación de

hidroxiapatita, pero a su vez no debe ser suficiente como para dejar que los cristales crezcan demasiado. Sin embargo un detalle difícil de evitar durante la síntesis fue que todas las apatitas en mayor o menor medida absorbieron CO_2 del ambiente y lo incorporaron como carbonato. Por otra parte la caracterización mediante FTIR fue muy acertada, debido a que las apatitas sintetizadas presentan aniones con modos vibracionales característicos de las apatitas nanoestructuradas, es decir que los aniones que están contenidos en ambientes no-apatíticos absorben en números de onda característicos. Siendo en este sentido particularmente útiles las bandas de absorción del fosfato y fosfato ácido dado que permiten diferenciar claramente los ambientes apatíticos de los no-apatíticos. Estas bandas fueron efectivamente encontradas mediante el procedimiento analítico empleado (espectroscopía derivada y deconvolución gráfica), corroborando la nanoestructuración de las apatitas sintetizadas y biológicas.

7 BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, R., N. H. Faisal, A. M. Paradowska, M. E. Fitzpatrick and K. A. Khor. Neutron diffraction residual strain measurements in nanostructured hydroxyapatite coatings for orthopaedic implants. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2011;4 (8):2043-2054.

Atkins, P. W. Técnicas de difracción. Química Física. Barcelona, España, Ediciones Omega, S.A.1999: 621-645.

Bazin, D., M. Daudon, C. Combes and C. Rey. Characterization and some physicochemical aspects of pathological microcalcifications. *Chem Rev.* 2012;112 (10):5092-5120.

- Boskey, A. L. and R. Mendelsohn. Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. *Vib Spectrosc.* 2005;38 (1-2):107-114.
- Botasini, S. Estudio de la cinética y estabilidad de soluciones de nanopartículas metálicas planas. Tesis de Licenciatura en Biquímica. UdelaR; (2009). p. 61.
- Bueno, E. M. and J. Glowacki. *Biologic Foundations for Skeletal Tissue Engineering* 2011.
- Cazalbou, S., C. Combes, D. Eichert and C. Rey. Adaptative physico-chemistry of bio-related calcium phosphates. *Journal of Materials Chemistry.* 2004a;14 (14):2148-2153.
- Cazalbou, S., C. Combes, D. Eichert, C. Rey and M. J. Glimcher. Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo. *J Bone Miner Metab.* 2004b;22 (4):310-317.
- Cazalbou, S., D. Eichert, X. Ranz, C. Drouet, C. Combes, M. F. Harmand and C. Rey. Ion exchanges in apatites for biomedical application. *J Mater Sci Mater Med.* 2005;16 (5):405-409.
- Dorozhkin, S. V. Amorphous calcium (ortho)phosphates. *Acta Biomater.* 2010;6 (12):4457-4475.
- Durmus, N. G. and T. J. Webster. Nanostructured titanium: the ideal material for improving orthopedic implant efficacy? *Nanomedicine (Lond).* 2012;7 (6):791-793.
- Eichert, D., C. Drouet, H. Sfihi, C. Rey and C. Combes. *Nanocrystalline Apatite-Based Biomaterials.* New York, USA: Nova Science Publishers, Inc; 2009.
- Eichert, D., H. Sfihi, M. Banu, S. Cazalbou, C. Combes and C. Rey. Surface structure of nanocrystalline apatites for bioceramics and coatings. 10 th Inter. Ceramics Congress & 3rd Forum of New Materials, CIMTEC 2002. Florence, Italy, Juillet.2002: 14-18.
- Faig-Martí, J. and F. J. Gil-Mur. Hydroxyapatite coatings in prosthetic joints. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (English Edition).* 2008;52 (2):113-120.
- Farlay, D., G. Panczer, C. Rey, P. D. Delmas and G. Boivin. Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral. *J Bone Miner Metab.* 2010;28 (4):433-445.
- Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil, I., M. A. Alobera-Gracia, M. del-Canto-Pingarron and L. Blanco-Jerez. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11 (1):E47-51.
- Fuller, J. L., G. E. Denehy and T. M. Schulein. *Concise Dental Anatomy and Morphology.* 4ta ed: University of Iowa College of Dentistry; 2001.
- Giraldo-Betancur, A. L., D. G. Espinosa-Arbelaez, A. d. Real-López, B. M. Millan-Malo, E. M. Rivera-Muñoz, E. Gutierrez-Cortez, P. Pineda-Gomez, S. Jimenez-Sandoval and M. E. Rodriguez-García. Comparison of physicochemical properties of bio and commercial hydroxyapatite. *Current Applied Physics.* 2013.
- Grossin, D., S. Rollin-Martinet, C. Estournes, F. Rossignol, E. Champion, C. Combes, C. Rey, C. Geoffroy and C. Drouet. Biomimetic apatite sintered at very low temperature by spark plasma sintering: physico-chemistry and microstructure aspects. *Acta Biomater.* 2010;6 (2):577-585.
- Hirota, M., T. Hayakawa, M. Yoshinari, A. Ametani, T. Shima, Y. Monden, T. Ozawa, M. Sato, C. Koyama, N. Tamai, T. Iwai and I. Tohnai. Hydroxyapatite coating for titanium fibre mesh scaffold enhances osteoblast activity and bone tissue formation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2012;41 (10):1304-1309.

- Holzwarth, U. and N. Gibson. The Scherrer equation versus the 'Debye-Scherrer equation'. *Nature Nanotechnology*. 2011;6 (9):534.
- Im, O., J. Li, M. Wang, L. G. Zhang and M. Keidar. Biomimetic three-dimensional nanocrystalline hydroxyapatite and magnetically synthesized single-walled carbon nanotube chitosan nanocomposite for bone regeneration. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2087-2099.
- J.J. Morales de Cano, A. G. R., J.A. Planell Estany, M.P. Ginebra Molis, and M. D. Y. J. A. H. Hermoso. Estudio de un cemento bioactivo de hidroxiapatita como material de substitución ósea. *Biomecánica*. 2002;10 ((1)):pp. 19-24.
- Jastrzebski, W., M. Sitarz, M. Rokita and K. Bulat. Infrared spectroscopy of different phosphates structures. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2011;79 (4):722-727.
- Jung, C. Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to study structural properties of cytochromes P450 (CYPs). *Anal Bioanal Chem*. 2008;392 (6):1031-1058.
- Kaneko, H., J. Kamiie, H. Kawakami, T. Anada, Y. Honda, N. Shiraishi, S. Kamakura, T. Terasaki, H. Shimauchi and O. Suzuki. Proteome analysis of rat serum proteins adsorbed onto synthetic octacalcium phosphate crystals. *Analytical Biochemistry*. 2011;418 (2):276-285.
- Kokubo, T. *Bioceramics and their clinical applications* 2008.
- Kold, S., O. Rahbek, M. Vestermark, S. Overgaard and K. Søballe. Bone Compaction Enhances Fixation of Weight-Bearing Hydroxyapatite-Coated Implants. *The Journal of Arthroplasty*. 2006;21 (2):263-270.
- Kuhn, L. T., M. D. Grynpas, C. C. Rey, Y. Wu, J. L. Ackerman and M. J. Glimcher. A comparison of the physical and chemical differences between cancellous and cortical bovine bone mineral at two ages. *Calcif Tissue Int*. 2008;83 (2):146-154.
- Kumar, R., K. H. Prakash, P. Cheang and K. A. Khor. Temperature Driven Morphological Changes of Chemically Precipitated Hydroxyapatite Nanoparticles. *Langmuir*. 2004;20:5196-5200.
- Kundu, B., D. Sanyal and D. Basu. Physiological and elastic properties highly porous hydroxyapatite potential for integrated eye implants: Effects of SIRC and L-929 cell lines. *Ceramics International*. (0).
- Lahiri, D., S. Ghosh and A. Agarwal. Carbon nanotube reinforced hydroxyapatite composite for orthopedic application: A review. *Materials Science and Engineering: C*. 2012;32 (7):1727-1758.
- Lebon, M., I. Reiche, J. J. Bahain, C. Chadeaux, A. M. Moigne, F. Fröhlich, F. Sémah, H. P. Schwarcz and C. Falguères. New parameters for the characterization of diagenetic alterations and heat-induced changes of fossil bone mineral using Fourier transform infrared spectrometry. *Journal of Archaeological Science*. 2010;37 (9):2265-2276.
- Lebon, M., I. Reiche, F. Frohlich, J. J. Bahain and C. Falgueres. Characterization of archaeological burnt bones: contribution of a new analytical protocol based on derivative FTIR spectroscopy and curve fitting of the $\nu_1 \nu_3$ PO₄ domain. *Anal Bioanal Chem*. 2008;392 (7-8):1479-1488.
- León, B. and J. A. Jansen. *Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants*. DOI 10.1007/978-0-387-77718-4_2: Springer Science + Business Media, LLC; 2009.
- Li, Z., P. Wang and Z. Wu. Preparation of nanosized hydroxyapatite particles at low temperatures. *Journal of Materials Science*. 2005;40 (24):6589-6591.
- Li, Z. Y., W. M. Lam, C. Yang, B. Xu, G. X. Ni, S. A. Abbah, K. M. C. Cheung, K. D. K. Luk and W. W. Lu. Chemical composition, crystal size

- and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. *Biomaterials*. 2007;28 (7):1452-1460.
- Liu, C., Y. Huang, W. Shen and J. Cui. Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11. *Biomaterials*. 2001;22 (4):301-306.
- Ma, M. G. Hierarchically nanostructured hydroxyapatite: hydrothermal synthesis, morphology control, growth mechanism, and biological activity. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:1781-1791.
- Manjubala, I., M. Sivakumar and S. N. Nikkath. Synthesis and characterisation of hydroxy/fluoroapatite solid solution. *Journal of Materials Science*. 2001;36 (22):5481-5486.
- Mathew, M. and S. Takagi. Structures of Biological Minerals in Dental Research. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*. 2001;106:1035-1044.
- Méndez, E. Electrocatálisis de moléculas modelo sobre electrodos de Platino y Rodio. Tesis de doctorado en Química. UdelaR; (2001). p. 272.
- Mozafari, M. R. (2007) *Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications*.
- Nalla, R. K., J. J. Kruzic, J. H. Kinney, M. Balooch, J. W. Ager Iii and R. O. Ritchie. Role of microstructure in the aging-related deterioration of the toughness of human cortical bone. *Materials Science and Engineering: C*. 2006;26 (8):1251-1260.
- Nasiri-Tabrizi, B. and A. Fahami. Mechanochemical synthesis and structural characterization of nano-sized amorphous tricalcium phosphate. *Ceramics International*. 2013.
- Nelson, S. J. and J. Major M. Ash. *Wheeler's dental anatomy, physiology and occlusion ninth ed: Saunders Elsevier*; 2010.
- O'Donnell, M. D., Y. Fredholm, A. de Rouffignac and R. G. Hill. Structural analysis of a series of strontium-substituted apatites. *Acta Biomater*. 2008;4 (5):1455-1464.
- Ozeki, K., T. Hoshino, H. Aoki and T. Masuzawa. Phase Composition of Sputtered Film from a Mixture Target of Hydroxyapatite and Strontium-apatite. *Journal of Materials Science & Technology*. 2013;29 (1):1-6.
- Padilla, S., I. Izquierdo-Barba and M. Vallet-Regí. High Specific Surface Area in Nanometric Carbonated Hydroxyapatite. *Chemistry of Materials*. 2008;20 (19):5942-5944.
- Panda, R. N., M. F. Hsieh, R. J. Chung and T. S. Chin. FTIR, XRD, SEM and solid state NMR investigations of carbonate-containing hydroxyapatite nano-particles synthesized by hydroxide-gel technique. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. 2003;64 (2):193-199.
- Pasteris, J. D., B. Wopenka, J. J. Freeman, K. Rogers, E. Valsami-Jones, J. A. M. van der Houwen and M. J. Silva. Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials. *Biomaterials*. 2004;25 (2):229-238.
- Penel, G., G. Leroy, C. Rey and E. Bres. MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcif Tissue Int*. 1998;63 (6):475-481.
- Pijls, B. G., E. R. Valstar, B. L. Kaptein, M. Fiocco and R. G. Nelissen. The beneficial effect of hydroxyapatite lasts: a randomized radiostereometric trial comparing hydroxyapatite-coated, uncoated, and cemented tibial components for up to 16 years. *Acta Orthop*. 2012;83 (2):135-141.
- Price, R. L., M. C. Waid, K. M. Haberstroh and T. J. Webster. Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon

- nanofibers. *Biomaterials*. 2003;24 (11):1877-1887.
- Rey, C., C. Combes, C. Drouet and M. J. Glimcher. Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporos Int*. 2009;20 (6):1013-1021.
- Rintoul, L., E. Wentrup-Byrne, S. Suzuki and L. Grondahl. FT-IR spectroscopy of fluoro-substituted hydroxyapatite: strengths and limitations. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18 (9):1701-1709.
- Sanín, L. H., T. González-Cossío, I. Romieu and M. Hernández-Avila. Acumulación de plomo en huesos y sus efectos en la salud. *Salud Pública de México*. 1998;40:359-368.
- Sato, M., M. A. Sambito, A. Aslani, N. M. Kalkhoran, E. B. Slamovich and T. J. Webster. Increased osteoblast functions on undoped and yttrium-doped nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium. *Biomaterials*. 2006;27 (11):2358-2369.
- Seo, D. S. and J. K. Lee. Dissolution of human teeth-derived hydroxyapatite. *Ann Biomed Eng*. 2008;36 (1):132-140.
- Shibli, S. M. A. and A. C. Jayalekshmi. Development of phosphate inter layered hydroxyapatite coating for stainless steel implants. *Applied Surface Science*. 2008;254 (13):4103-4110.
- Skoog, D. A., D. M. West, F. J. Holler, and S. R. Crouch. *Fundamentos de Química Analítica*. Octava ed. México: International Thomson Editores, S. A.; 2005.
- Sun, F., H. Zhou and J. Lee. Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration. *Acta Biomater*. 2011;7 (11):3813-3828.
- Suzuki, O., S. Kamakura, T. Katagiri, M. Nakamura, B. Zhao, Y. Honda and R. Kamijo. Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite. *Biomaterials*. 2006;27 (13):2671-2681.
- Svanborg, L. M., M. Hoffman, M. Andersson, F. Currie, P. Kjellin and A. Wennerberg. The effect of hydroxyapatite nanocrystals on early bone formation surrounding dental implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2011;40 (3):308-315.
- Tambasco de Oliveira, P. and A. Nanci. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials*. 2004;25 (3):403-413.
- Trommer, R. M., L. A. Santos and C. P. Bergmann. Nanostructured hydroxyapatite powders produced by a flame-based technique. *Materials Science and Engineering: C*. 2009;29 (6):1770-1775.
- Voigt, J. D. and M. Mosier. Hydroxyapatite (HA) coating appears to be of benefit for implant durability of tibial components in primary total knee arthroplasty. *Acta Orthop*. 2011;82 (4):448-459.
- Waly, T., M. D. Kennedy, G.-J. Witkamp, G. Amy and J. C. Schippers. The role of inorganic ions in the calcium carbonate scaling of seawater reverse osmosis systems. *Desalination*. 2012;284 (0):279-287.
- Weiner, S. and O. Bar-Yosef. State of Preservation of Bones from Prehistoric Sites in the Near East: A Survey. *Journal of Archaeological Science*. 1990;17:187-196.
- Wu, Y.-S., Y.-H. Lee and H.-C. Chang. Preparation and characteristics of nanosized carbonated apatite by urea addition with coprecipitation method. *Materials Science and Engineering: C*. 2009;29 (1):237-241.
- Xian, W. *A Laboratory Course in Biomaterials*. United States of America: CRC Press; 2009.
- Zhou, H. and J. Lee. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue

engineering. Acta Biomater. 2011;7 (7):2769-2781.