



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA
CALIFORNIA**

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA SÍNTESIS
DE HIDROXIAPATITA A PARTIR DE ESPINAS DE ERIZO DE MAR
*STRONGYLOCENTROTUS PURPURATUS***

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOINGENIERO

PRESENTA:

NAYELI SARAHÍ GOMEZ VÁZQUEZ

ENSENADA B. C. A 15 DE AGOSTO DE 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA SÍNTESIS DE
HIDROXIAPATITA A PARTIR DE ESPINAS DE ERIZO DE MAR
*STRONGYLOCENTROTUS PURPURATUS***

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER TÍTULO DE

BIOINGENIERO

PRESENTA:

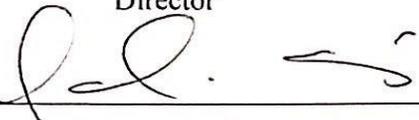
NAYELI SARAHÍ GOMEZ VÁZQUEZ

APROBADA POR:



Dr. Priscy Alfredo Luque Morales

Director



Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez

Sinodal

(Vocal)



Dr. Rubén Cesar Villarreal Sánchez

Codirector



Dra. Zaira Itzel Bedolla Valdez

Sinodal

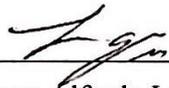
(Vocal)

RESUMEN

De la tesis de **Nayeli Sarahí Gómez Vázquez**, presentada como requisito para la obtención del título de **BIOINGENIERO**, Ensenada, Baja California, Agosto 2019.

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA A PARTIR DE ESPINAS DE ERIZO DE MAR *STRONGYLOCENTROTUS PURPURATUS*

Resumen aprobado por:



Dr. Priscy Alfredo Luque Morales

Director



Dr. Rubén Cesar Villarreal Sánchez

Codirector

Hidroxiapatita de tamaño nanométrico se sintetizó a partir de espinas de desecho de erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* utilizando un método de precipitación y tratamiento térmico a tres distintas temperaturas, 500, 600 y 700°C. Los cristales obtenidos fueron caracterizados para determinar los grupos funcionales, tamaño de partícula, morfología y composición elemental mediante Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR), Difracción de Rayos X (DRX) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) acoplada a Espectroscopía de Rayos X de Dispersión de Energía (EDS), respectivamente. Los resultados mostraron que la temperatura a la que se somete el proceso de síntesis es decisiva para determinar características propias del material, tales como el tamaño de partícula y la relación Ca/P.

Palabras clave: *Biomaterial, Hidroxiapatita, Biominerales, Erizo de mar, Relación Ca/P, Tratamiento térmico, FTIR, SEM-EDS, DRX, Estructura cristalina.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Laura Vázquez y José Gomez, por ser pilares en mi formación académica y haber depositado siempre su confianza en mí, gracias infinitas.

A mis hermanos, por estar siempre presentes, por quererme y apoyarme en lo que necesito, gracias.

A mis compañeros y amigos, por ser cómplices de mis desvelos y darme tantos momentos de alegría y diversión durante mi formación, gracias.

A Gabriel Arce, Julia Álvarez y Rosa Figueroa, por regalarme su amistad incondicional y sus palabras de aliento en todo momento, gracias.

A mi compañero de vida, Juan Olmedo, por darme su amor y comprensión durante todos estos años, gracias.

A los profesores Priscy Alfredo Luque y Rubén Cesar Villarreal, por todo el apoyo brindado durante mi carrera y ser partícipes en la realización de mi tesis, gracias.

A CONACyT, por el apoyo de la beca brindada con el número de proyecto 4940 de problemas nacionales.

“Perseverar para alcanzar”

CONTENIDO

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN	10
1.1. BIOMATERIALES.....	11
1.2. BIOMINERALES	12
1.3. ERIZO DE MAR.....	13
1.4. HIDROXIAPATITA.....	13
1.5. REACCIÓN QUÍMICA.....	14
1.6. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	15
1.6.1. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier	15
1.6.2. Difracción de Rayos X (DRX)	18
1.6.3. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) - Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersa (EDS).....	20
1.7 HIPÓTESIS	22
1.8 OBJETIVOS	22
1.8.1 General.....	22
1.8.2. Específicos.....	22
1.9 JUSTIFICACIÓN	23

CAPÍTULO II

II. DESARROLLO EXPERIMENTAL	25
2.1. Desarrollo de Síntesis	25
2.2. Diseño Experimental	28
2.3. Balance De Materia	30
2.4. Balance De Energía	30
2.4. Caracterización	33

CAPÍTULO III

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES	36
--	-----------

3.1	Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)	36
3.2	Difracción de Rayos X (DRX)	41
3.2.1	Difractograma.....	41
3.2.2	Tamaño promedio de cristales.....	42
3.3	Microscopia Electrónica de Barrido - Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersa (SEM-EDS)	44
3.3.1	Morfología.....	44
3.3.2	Composición Química Elemental.....	47
3.3.3	Relación Ca/P	48
CAPÍTULO IV		
	IV. CONCLUSIONES	52
CAPÍTULO V		
	V. REFERENCIAS.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de un espectrómetro básico de IR de transformada de Fourier (Skoog, D. et al., 2007).	17
Figura 2. Composición de un Microscopio Electrónico de Barrido (unab, n.d.).....	21
Figura 3. Diagrama esquemático del proceso para la obtención de Hidroxiapatita.	25
Figura 4. Preparación del polvo de espinas de erizo de mar. A) Lavado mediante agua destilada; B) Secado en horno por 30 min; C) Molienda hasta obtener polvo fino.....	26
Figura 5. Obtención de Óxido de Calcio. A) Calcinación del polvo de espinas de erizo de mar; B) Polvo obtenido tras la calcinación.	26
Figura 6. Réplicas y control negativo para la obtención de Hidroxiapatita. Réplica no. 1 se muestra a la izquierda, continuando hacia la derecha con las otras replicas. Control negativo se muestra en el extremo derecho.	27
Figura 7. Réplicas tras el proceso de agitación y temperatura a 35°C por 18 horas. A) Réplica no.1; B) Réplica no.2; C) Réplica no.3; D) Control negativo.	27
Figura 8. Filtración y lavado de cada replica.....	28
Figura 9. Productos obtenidos tras el tratamiento térmico de 1 hora. A) Réplica no.1; B) Réplica no.2; C) Réplica no.3; D) Control negativo.....	28
Figura 10. Espectro de FTIR obtenido para CaO.	37
Figura 11. Control positivo, HA comercial (Bouropoulos, Stampoulakis, & Mouzakis, 2011).	38
Figura 12. Espectro de FTIR obtenido del control negativo.....	39
Figura 13. Espectro FTIR de los tres materiales sintetizados a diferentes temperaturas.....	41
Figura 14. Espectro de DRX obtenido para los tres materiales sintetizados a distintas temperaturas.	42
Figura 15. Diagrama de caja y bigotes del tamaño promedio de cristales obtenidos para cada material sintetizado.	43
Figura 16. Imagen obtenida mediante SEM para el material sintetizado a 500°C.	45
Figura 17. Imagen obtenida mediante SEM para el material sintetizado a 600°C.	46
Figura 18. Imagen obtenida mediante SEM para el material sintetizado a 700°C.	46

Figura 19. Espectro obtenido mediante EDS para el material sintetizado a 500°C.....	47
Figura 20. Espectro obtenido mediante EDS para el material sintetizado a 600°C.....	48
Figura 21. Espectro obtenido mediante EDS para el material sintetizado a 700°C.....	48
Figura 22. Diagrama de caja y bigotes de la relación Ca/P obtenido para cada material sintetizado.	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Regiones del espectro infrarrojo (Skoog, D. et al., 2007).....	16
Tabla 2. Diseño experimental para el lote a tratamiento térmico de 500°C.	29
Tabla 3. Diseño experimental para el lote a tratamiento térmico de 600°C.	29
Tabla 4. Diseño experimental para el lote a tratamiento térmico de 700°C.	29
Tabla 5. Balance de materia en gramos para cada reacción involucrada en el lote de tratamiento térmico a 500°C.	30
Tabla 6. Balance de materia en gramos para cada reacción involucrada en el lote de tratamiento térmico a 600°C.	31
Tabla 7. Balance de materia en gramos para cada reacción involucrada en el lote de tratamiento térmico a 700°C.	31
Tabla 8. Tamaño promedio de cristales para cada HA sintetizada.	44
Tabla 9. Relación Ca/P promedio para cada material sintetizado.....	50



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN



CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN

A través de la historia, el hombre ha buscado implementar materiales con características específicas que permitan reemplazar o modificar estructuras en el cuerpo humano con la finalidad de sustituir, recuperar la funcionalidad de un tejido o mejorar su comportamiento.

La primera terapia empleada para reparar lesiones de tipo óseo, y que se mantiene hasta hoy, consiste en la implantación de prótesis hechas de materiales que son capaces de restablecer el funcionamiento mecánico de los huesos. Implantes hechos de materiales tales como titanio y cementos óseos, son capaces de lograr este objetivo. Sin embargo, conllevan una serie de efectos secundarios que limitan su efectividad. El primero es la falta de osteointegración, es decir, el grado de interacción entre los materiales implantados y el tejido circundante es mínimo y acarrea un problema aun mayor, el daño de más tejido (Goloshchapov et al., 2013).

Debido a la falta de integración, las fuerzas de roce causadas durante el movimiento del paciente van desgastando el tejido óseo que se encuentra próximo al implante y provocan daños estructurales. Además, no solo los alrededores sufren daños, sino que también el material de dicho implante se desgasta teniendo la posibilidad de fracturarse (Álvarez, J., 2009). Otro problema es la toxicidad del material o la baja resistencia mecánica del reemplazo para suplir las funciones que debía llevar a cabo, lo cual resulta fatal en muchos casos (Presenda, A., 2014).

En cualquiera de los casos, ya sea daños estructurales del hueso nativo o el colapso del implante o la aparición de infecciones, serán necesarias intervenciones quirúrgicas posteriores, que resultan en más dolor para el paciente y disminuyen las posibilidades de éxito del proceso terapéutico. Dada la complejidad de un sistema biológico como el cuerpo humano, existen sólo algunos materiales que poseen las características necesarias para

integrarse adecuadamente y que además puedan realizar las funciones de los elementos que reemplazan.

Por consiguiente, es de crucial importancia desarrollar tecnologías alternativas que produzcan implantes biocompatibles que puedan recuperar la funcionalidad del área afectada mediante la inducción de formación de nuevo tejido.

1.1. BIOMATERIALES

Un biomaterial se puede definir como un dispositivo material o implante utilizado para reparar/ reemplazar tejidos nativos del cuerpo, o como materiales de andamiaje adoptados para construir tejidos y órganos artificiales(Chen & Liu, 2016). Por otro lado, la ciencia de los biomateriales es la encargada del estudio de la interacción entre sistemas biológicos y materiales sintéticos o modificados naturalmente(Goloshchapov et al., 2013).

El área de investigación y desarrollo de los biomateriales es uno de los de mayor crecimiento en los últimos años, se busca principalmente 2 cosas: diversas fuentes de obtención además de las fuentes comunes y que tenga impacto en la eficiencia de obtención refiriéndose a cantidades y costos (Alexander, S. et al., 2007).

Entre algunos ejemplos de aplicaciones de los biomateriales se encuentran los sustitutos para válvulas del corazón (Lam & Wu, 2012), los reemplazos de articulaciones de cadera (Hu & Yoon, 2018), las prótesis dentales (Duraccio, Mussano, & Faga, 2015) y los lentes intraoculares (Tighe & Mann, 2016).

Muchos de los implantes médicos están hechos con metales como el titanio y sus aleaciones estos cuentan con propiedades mecánicas peculiares, como resistencia, baja densidad y estabilidad química en los fluidos corporales. Sin embargo, debido a que el hueso receptor se encuentra más deteriorado, sufre de baja osteointegración (Lario-Femenía et al., 2016). Agregado a esto, la mayoría de los implantes fallan debido a que se pierde la interfase entre el implante y el hueso, contribuyendo al fallo del implante, y una deficiente osteointegración (Lario, J. et al., 2016)

Un sustituto ideal del injerto óseo debe ser: osteoconductor, osteoinductor, biocompatible, biorreabsorbible, estructuralmente similar al hueso, fácil de usar y rentable (Forriol, F., 2005). Además, deben actuar como un sistema de entrega para diferentes factores de crecimiento y fármacos antiinflamatorios y antibacterianos, evitando su rechazo después de la implementación (Szcześ, Hołysz, & Chibowski, 2017) Así mismo, puede ser capaz de formar una interfaz de unión con el tejido óseo, descomponerse a tiempo y finalmente ser completamente reemplazada por tejido óseo autólogo (Zhang et al., 2019).

Por otro lado, el uso de materiales de injerto óseo en autoinjertos conlleva el problema de no formar las estructuras o naturaleza deseada y la morbilidad del sitio donante (Sathiyavimal, Vasantharaj, LewisOscar, Pugazhendhi, & Subashkumar, 2019). Además, existen riesgos en cuanto a la transmisión de enfermedades debido a la antigenicidad y potencial transmisión de agentes infecciosos(Zhang et al., 2019).

1.2.BIOMINERALES

Las partes minerales de organismos vivos ha sido, y sigue siendo, estudiada intensamente por biólogos, químicos, mineralogistas y científicos de materiales, buscando métodos novedosos para la síntesis de materiales (Borzęcka-Prokop, Wesełucha-Birczyńska, & Koszowska, 2007).

Los biominales, desarrollados hace más de 3500 millones de años, se han desarrollado en una variedad de organismos concibiéndoles diferentes funciones, tales como protección contra otros depredadores o como estructura de soporte. Entre 60 minerales diferentes el CaCO_3 es el más abundante (Barrera, A., 2014) y esto se debe a que el catión Ca es esencial en funciones del metabolismo celular (Galván, L., 2014)

1.3.ERIZO DE MAR

Entre las ventajas que ofrece el uso de animales marinos, así como el erizo de mar, para la síntesis de biomateriales de tipo óseo se tiene la configuración de su microestructura, ya que es similar a la de los huesos humanos. Así mismo, disponen de una alta macroporosidad útil para la vascularización, proliferación de células óseas y la angiogénesis (Taylor, Andric, & Freeman, 2013).

S. purpuratus es el erizo de mar intermareal común de hábitat rocosos en casi todos los afloramientos a lo largo de la costa oeste desde Torch Bay, Alaska hasta Isla de Cedros, Baja California México (Workman, G., 1999). Sus espinas y caparazón están compuestas principalmente de calcita rica en Magnesio (Vecchio, Zhang, Massie, Wang, & Kim, 2007), superando el contenido de este último en un 2.26 en comparación con las espinas (LaVigne et al., 2013). Por otro lado, estudios demuestran que las espinas de *S. Purpuratus* contienen ~4% menos $MgCO_3$ que otras especies de erizos estudiados anteriormente (LaVigne et al., 2013).

1.4.HIDROXIAPATITA

La Hidroxiapatita, abreviada como HAp o HA, es un mineral con excelente biocompatibilidad y osteoconducción (Dorozhkin, 2010), está compuesta por átomos de Calcio (Ca), Fósforo (P) y Oxígeno (O) que tiene como fórmula general $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Tiene una estructura cristalina con forma hexagonal y presenta una propiedad de polarización eléctrica que favorece el crecimiento de los osteoblastos, células involucradas en el crecimiento de los huesos (“Nanoestructuras de hidroxiapatita, gran avance hacia la regeneración de huesos,” n.d.). Es el componente principal y más importante, para el soporte de los tejidos mineralizados (García, M. et al., 2006). Puede ser sintetizada a partir de componentes inorgánicos o de fuentes orgánicas naturales. Sin embargo, recurrir a fuentes orgánicas disminuye costos de proceso a comparación de las rutas sintéticas (Akram, Ahmed, Shakir, Ibrahim, & Hussain, 2014).

Para el desarrollo de HAp es posible utilizar diferentes fuentes biogénicas. Una de ellas es la obtención de hidroxiapatita a partir de los huesos, por ejemplo, hueso cortical bovino (Khoo, Nor, Ardhyanta, & Kurniawan, 2015), posteriormente se trata a alta temperatura para obtener el polvo de HAp blanco y finalmente su molienda para obtener el tamaño de partícula deseado. Otro método es el uso de los huesos de pescado (Sunil & Jagannatham, 2016). Una tercera síntesis de este material es utilizando precursores biogénicos de las cáscaras de huevo (Wu, Hsu, Hsu, Chang, & Ho, 2016) o exoesqueletos de organismos marinos (Damien & Revell, n.d.), se obtiene después de su calcinación CaO y tras su hidratación y reacción con H_3PO_4 se precipita el biocerámica HAP.

Se ha encontrado que, existe gran variedad de fases de cerámicas de Fosfatos de Calcio, donde variables como la temperatura y el pH se ven involucradas para definir el tipo de cerámica que se obtendrá, así como su relación Ca/P (Reyes, B. 2016) y grado de cristalinidad (Lee, Zavgorodniy, Loo, & Rohanzadeh, 2012), (Ahmed, n.d.). No obstante, la mayoría de síntesis para la obtención de estas cerámicas buscan llegar a producir una relación estequiométrica Ca/P de 1.67. Esto debido a que, dicha relación en el tejido óseo se encuentra entre 1.5 y 1.9, lo cual, al tener esta característica similar, permite una mejor osteoconducción (Barakat, Khil, Omran, Sheikh, & Kim, 2009).

Vale la pena mencionar que, el grado de cristalinidad de la HAp se relaciona con las propiedades mecánicas que tendrá dicha cerámica, permitiendo así, que sea adecuada para aplicaciones de ortopedia. Por ejemplo, el HAp sintetizado con un tratamiento térmico de hasta $1200^{\circ}C$ demostró un aumento en la dureza y la resistencia a la fractura (Ahmed, n.d.), sin embargo, a pesar de ser ventajoso, las limitaciones permanecen en la dificultad para una HAp cristalina.

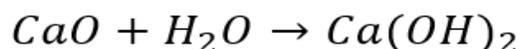
1.5. REACCIÓN QUÍMICA

La síntesis de HAp en este estudio será encaminado conforme al método de precipitación. Este consiste en obtener el componente inicial para la reacción química - óxido de calcio (CaO) - mediante el tratamiento térmico de las espinas de erizo de mar.

Bajo temperatura, el Carbonato de Calcio (CaCO_3) procedente de las espinas de *S. Purpuratus* es disociado a Óxido de Calcio (CaO) y Dióxido de Carbono (CO_2):



Tras obtener el Óxido de Calcio (CaO), este es hidratado con agua destilada para obtener Hidróxido de Calcio (Ca(OH)_2):



Al Hidróxido de Calcio obtenido se adiciona una solución de Ácido Fosfórico (H_3PO_4) al 85% y se deja reaccionar durante 18 h a 35°C para producir la Hidroxiapatita (HAp):



Finalmente, mediante lavados de agua destilada se debe controlar el pH de la reacción hasta llegar a pH neutro.

1.6.TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

1.6.1. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

1.6.1.1.FUNDAMENTO

La región infrarroja del espectro comprende radiación con número de onda que va desde 12 800 hasta 10 cm^{-1} . Sin embargo, dadas las aplicaciones de esta región, es conveniente dividirlo en tres regiones, las cuales son: Infrarrojo cercano, medio y lejano, como se muestra en la tabla 1. Dentro de la región del IR medio existen dos regiones, una de ellas es la llamada de los grupos funcionales, y va desde 4000 cm^{-1} a 1300 cm^{-1} , y la región dactilar de 1300 cm^{-1} a 670 cm^{-1} .

Tabla 1. Regiones del espectro infrarrojo (Skoog, D. et al., 2007).

Región	Longitud de onda (λ), μm	Número de onda ($\tilde{\nu}$) cm^{-1}	Frecuencias (ν), Hz
Cercana	0.78 a 2.5	12 800 a 4000	3.8×10^{14} a 1.2×10^{14}
Media	2.5 a 50	4000 a 200	1.2×10^{14} a 6.0×10^{12}
Lejana	50 a 1000	200 a 10	6.0×10^{12} a 3.0×10^{11}
La más utilizada	2.5 a 15	4000 a 670	1.2×10^{14} a 2.0×10^{13}

Este tipo de espectroscopía es utilizada para determinar los grupos funcionales presentes en las moléculas debido a la absorción característica de las mismas dentro del espectro infrarrojo. Cuando dichas moléculas se exponen a la radiación infrarroja, estas absorben selectivamente la radiación de longitudes de onda específicas que causa el cambio en el momento dipolar de las moléculas de la muestra. Dado esto, los niveles de energía vibracional de las moléculas son transferidos desde el estado fundamental o basal, hasta el estado excitado (Birkner, Nancy, Wang, 2019).

Vale la pena mencionar que, la intensidad de los picos de absorción dependerá del cambio en el momento dipolar de las moléculas, así como de la transición de los niveles de energía. Lo anterior debido a la producción de una fluctuación regular en su momento dipolar, mismo que establece un campo que puede interactuar con el campo eléctrico asociado con la radiación. Es decir, si la frecuencia de la radiación coincide exactamente con la frecuencia de vibración natural de la molécula, habrá lugar a la absorción de la radiación, provocando un cambio en la amplitud de la vibración molecular (Skoog, D. et al., 2007).

Por lo tanto, para el caso de moléculas homonucleares, no habrá generación de picos en la región del IR, debido al cambio dipolo cero en la vibración y rotación de estas moléculas (Medina, J. et al., 2005)

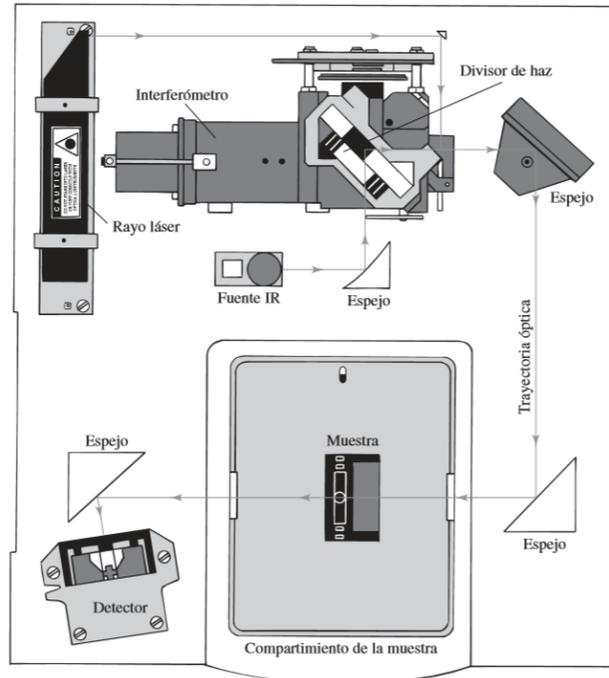


Figura 1. Diagrama de un espectrómetro básico de IR de transformada de Fourier (Skoog, D. et al., 2007).

La radiación procedente de la fuente IR es reflejada en el interferómetro, donde es modulada por el espejo móvil. Posteriormente, la radiación modulada es reflejada por ambos espejos situados en la parte derecha de interferómetro hasta atravesar la muestra y llegar al transductor. Finalmente, un sistema de adquisición de datos conectado al transductor se encarga de registrar la señal y almacenarla en la memoria de una computadora en forma de interferograma (Skoog, D. et al., 2007).

1.6.1.2.APLICACIONES

La técnica de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier se encuentra ampliamente extendida por el mundo de la industria. Suele ser utilizada en: ciencia de los materiales, agricultura, cosméticos, ciencias de la tierra, control medioambiental, medicina y química clínica, industria farmacéutica, industria del petróleo, industria textil, entre muchas otras. Así mismo, a continuación, se muestran algunos ejemplos donde la espectroscopia Infrarroja es útil.

- Predicción de la resistencia de las plantas a la infestación de insectos (Rutherford & Van Staden, 1996)
- Análisis del proceso de fermentación en la cerveza (Vann, Layfield, & Sheppard, 2017)
- Estudio de membranas biológicas en superficies solidas (Baker et al., 2014)
- Medición de proteína total en soluciones acuosas (Yang, Yang, Kong, Dong, & Yu, 2015)
- Detección remota de contaminantes de gases y vapores en el aire (Fuentes, M. et al. 2008)
- Medición de la degradación de aceites (Coates & Setti, 1986)
- Entre otros

1.6.2. Difracción de Rayos X (DRX)

1.6.2.1.FUNDAMENTO

Para aplicar esta técnica se utiliza radiación X, misma que está comprendida entre la radiación ultravioleta y los rayos Gamma. Este tipo de radiación se produce cuando una partícula de masa pequeña y elevada energía cinética, como lo son los electrones, son impactados sobre la materia, produciendo perturbación en la misma donde parte de la energía se dedica a producir radiación X (Bermúdez, P., 1981).

Cuando los rayos X son dispersados por el entorno ordenado de un cristal, se producen interferencias constructivas y destructivas entre los rayos dispersados, ya que las distancias entre los átomos son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación. Un solo átomo dispersa un haz incidente de rayos X en todas las direcciones, sin embargo, al hablar de un gran número de átomos ordenados de manera periódica en tres dimensiones, estos difractan dichos rayos en unas pocas direcciones. Esto ocurre debido a que la ordenación periódica de los átomos genera una interferencia destructiva de los rayos dispersados en todas las direcciones excepto en aquellas que predice la Ley de Bragg. La

Ley de Bragg establece la condición esencial que debe cumplirse para que se produzca difracción (Pérez, J., s/a).

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

Donde:

λ = longitud de onda de los rayos X (Cu = 0.15418 nm)

d = distancia entre los planos paralelos considerados

θ = ángulo de incidencia

n = número entero que corresponde al orden de difracción

Además, un difractograma permite identificar el tamaño de las partículas que generan dichas reflexiones. Para esto, se utiliza la ecuación de Scherrer, misma que relaciona la forma de la reflexión de un plano de átomos y la dimensión del cristal en la dirección de ese plano (Elliott, 2008).

$$\tau = \frac{k\lambda}{\beta\cos\theta}$$

Donde:

τ = tamaño del cristal en la dirección evaluada (nm)

λ = longitud de onda de la radiación de los rayos x (Cu = 0.15404 nm)

θ = ángulo de difracción en la reflexión evaluada

k = constante que depende de la forma del cristal (esfericas $k = 0.9$)

β = ancho que presenta la reflexión a la mitad de la altura (FWHM)

1.6.2.2. APLICACIONES

La información que se obtiene a partir de un difractograma permite identificar a que sistema cristalino pertenece la muestra que se está analizando, determinar la distribución de átomos dentro de los cristales, así como calcular el tamaño de los mismos (Aparicio, M. et al. 2010). Entre las aplicaciones que brinda este análisis se enumeran las siguientes.

- Determinar estructuras de compuestos para asociarlas con sus propiedades (Petrick, S. et al. 2005)
- Definición de distintos minerales presentes en un proceso metalúrgico (Tuesta, E. et al. s/a)
- Estudio de texturas (Sivakumar, Sampath Kumar, Shantha, & Panduranga Rao, 1996)
- Determinación del tamaño de partícula como herramienta para mejorar fármacos (Walter, J. et al., 2013)
- Entre otras

1.6.3. *Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) - Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersa (EDS)*

1.6.3.1. FUNDAMENTO

Un microscopio electrónico de barrido o SEM es un microscopio que se encarga de formar imágenes a partir del uso de electrones que pasan a través de una columna en la que se ha hecho un vacío. En ella, el haz inicial es concentrado por una serie de lentes electromagnéticas (condensadora, objetivo) desde unos 25.000-50.000 nm hasta unos 10 nm. Al mismo tiempo, la intensidad de corriente se disminuye e implica una menor cantidad de electrones primarios (Ipohorski, M. et al., 2013).

En la interacción del haz electrónico con la superficie se producen e- secundarios que, tras ser captados por un detector, son hechos incidir sobre un "scintillator", donde cada e- dará

origen a varios fotones. Dichos fotones son dirigidos hasta un fotomultiplicador a través del cañón de luz y, ya en aquél, cada fotón dará origen a un fotoelectrón que, a través de una serie de dinodos con diferencias de potencial crecientes produce, mediante un efecto en cascada, gran cantidad de e- secundarios (Piqueras, J. et al., s/a).

En definitiva, lo que se ha conseguido ha sido una amplificación de la corriente debida a los e- secundarios originales o, dicho de otro modo, una amplificación de la información sobre la muestra suministrada de dichos e-. Los e- secundarios, finalmente, previo paso por un video amplificador, son dirigidos hacia un tubo semejante a un osciloscopio de rayos catódicos (ORC) (Piqueras, J. et al., s/a) sobre cuya pantalla se obtendrán las imágenes correspondientes a los electrones secundarios o electrones electrodispersados emitidos al finalizar la interacción con la muestra del haz incidente de entre 5 y 30 KeV (Universidad Andres Bello, n.d.)

Cabe destacar que la emisión de los electrones electrodispersados dependerá del número atómico de la muestra. Mientras más grande sea este, habrá mayor cantidad de electrones electrodispersados.

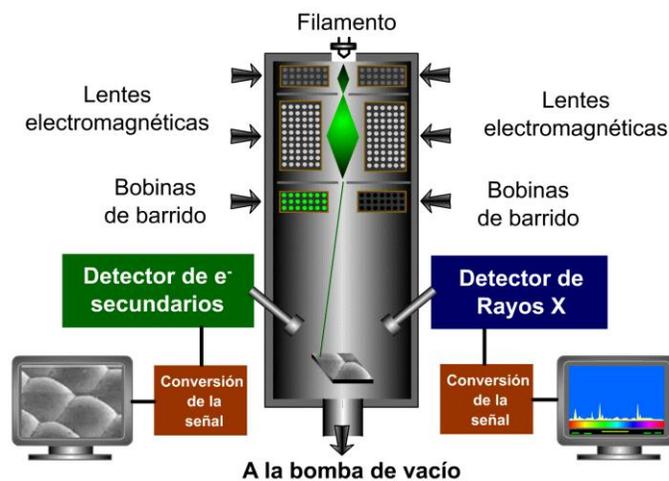


Figura 2. Composición de un Microscopio Electrónico de Barrido (unab, n.d.).

1.6.3.2.APLICACIONES

Las aplicaciones del Microscopio Electrónico de Barrido son muy variadas. A continuación, se enlistan algunas de ellas.

- Caracterización de materiales (Clavijo, J., 2013)
- Estudio de direccionalidad de las varillas del esmalte dental (Gasga, J., 2013)
- Estudio de fibras textiles (Montero, L., 2012)
- Morfología celular de bacterias (Gallut, P., 2016)
- Estudio de materiales con cambio de fase (Juárez D. et al. 2012)
- Entre otras

1.7 HIPÓTESIS

La temperatura en la síntesis de hidroxiapatita a partir de espinas de desecho de *Strongylocentrotus purpuratus* modifica el tamaño de partícula.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 General

Estudiar el efecto de la temperatura en la producción de Hidroxiapatita sintetizada a partir de espinas de erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*.

1.8.2 Específicos

- Sintetizar Hidroxiapatita mediante química verde
- Someter la Hidroxiapatita a tratamientos térmicos de 500,600 y 700°C
- Comparar la Hidroxiapatita obtenida de la síntesis verde a los diferentes tratamientos térmicos
- Caracterizar la Hidroxiapatita obtenida mediante ensayos de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y Difracción de Rayos X (DRX) y Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) acoplada a Espectroscopia de Dispersión de Rayos X (EDS)

- Determinar tamaño de partículas promedio utilizando la ecuación de Scherrer
- Determinar relación Ca/P
- Determinar balance de materia y energía

1.9 JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los implantes óseos están hechos de materiales como titanio o aceros inoxidables. Sin embargo, estos suelen tener baja o nula osteointegración, impidiendo de esta manera, la formación de nuevo tejido por parte del organismo. Por su parte, la Hidroxiapatita, es un material que puede ser utilizado para la regeneración de huesos debido a que es altamente osteoconductor, biocompatible así como químicamente estable.

Teniendo en cuenta que las cerámicas que están siendo fabricadas para aplicaciones médicas, como lo es la Hidroxiapatita, estas deberán soportar una serie de características químicas y mecánicas para cumplir con su objetivo, por lo que, resulta necesario relacionar la estructura del material con su comportamiento térmico y las variaciones que tiene este con la función que desarrollará.

Dicho lo anterior, en el presente trabajo se abordará la síntesis de Hidroxiapatita a tres tratamientos térmicos diferentes, considerándose el uso de espinas de desecho de erizo de mar como precursor para dicha síntesis.



CAPÍTULO II
DESARROLLO
EXPERIMENTAL



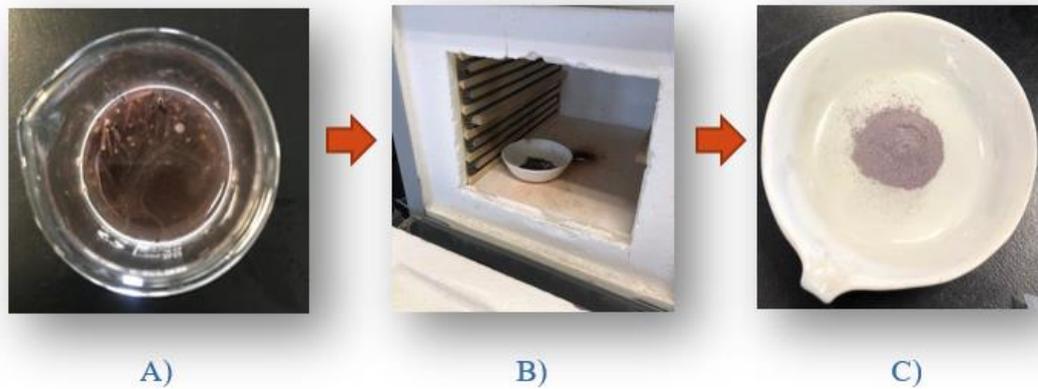


Figura 4. Preparación del polvo de espinas de erizo de mar. A) Lavado mediante agua destilada; B) Secado en horno por 30 min; C) Molienda hasta obtener polvo fino.

Para la primera síntesis, el polvo obtenido tras la molienda de las espinas se introdujo a 800°C durante 10 min en la mufla. Tras esta reacción se esperó la obtención de Óxido de Calcio.

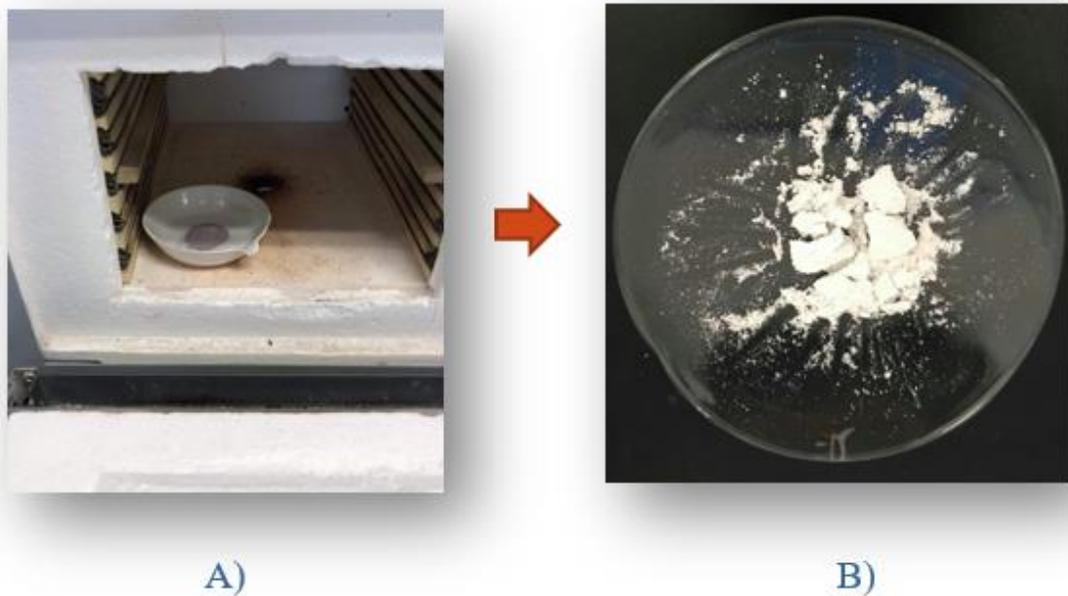


Figura 5. Obtención de Óxido de Calcio. A) Calcinación del polvo de espinas de erizo de mar; B) Polvo obtenido tras la calcinación.

Para la segunda síntesis, el CaO obtenido fue dividido en cuatro réplicas y suspendido en agua destilada para su hidratación. Se dejó en agitación magnética y a 35°C durante 15 min en una plancha. Como resultado de esta reacción se esperó la obtención del precursor de Hidroxiapatita, Ca (OH)₂.



Figura 6. Réplicas y control negativo para la obtención de Hidroxiapatita. Réplica no. 1 se muestra a la izquierda, continuando hacia la derecha con las otras réplicas. Control negativo se muestra en el extremo derecho.

Para la tercera síntesis, se procedió a adicionar gota a gota el H₃PO₄ en el producto de la síntesis anterior, considerando en todo momento la agitación continua. Dicha reacción se dejó en agitación magnética durante 18 h a 35°C.

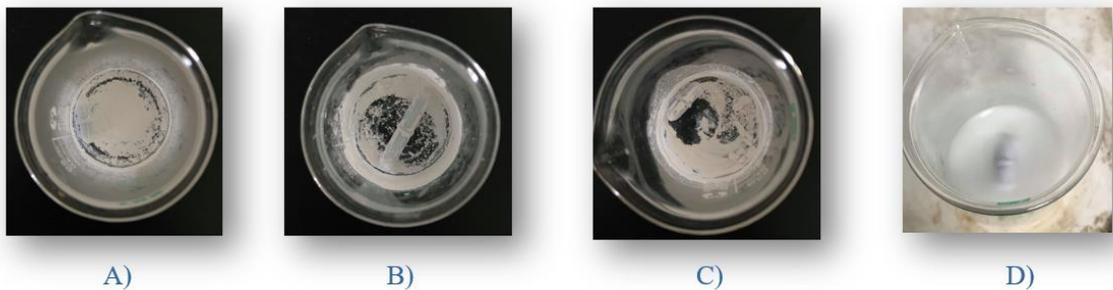


Figura 7. Réplicas tras el proceso de agitación y temperatura a 35°C por 18 horas. A) Réplica no.1; B) Réplica no.2; C) Réplica no.3; D) Control negativo.

Posteriormente, el producto fue filtrado y lavado con agua destilada hasta lograr obtener un pH neutro.

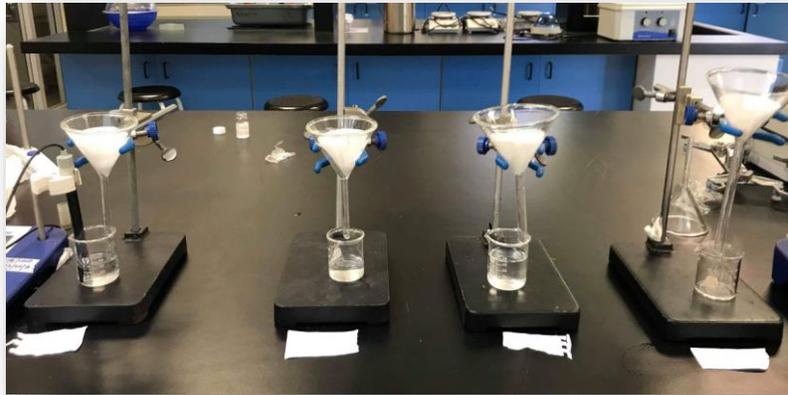


Figura 8. Filtración y lavado de cada replica.

Finalmente, utilizando planchas, el producto se secó a 60°C durante toda la noche y finalmente se realizó el tratamiento térmico correspondiente por 1 h utilizando una mufla.

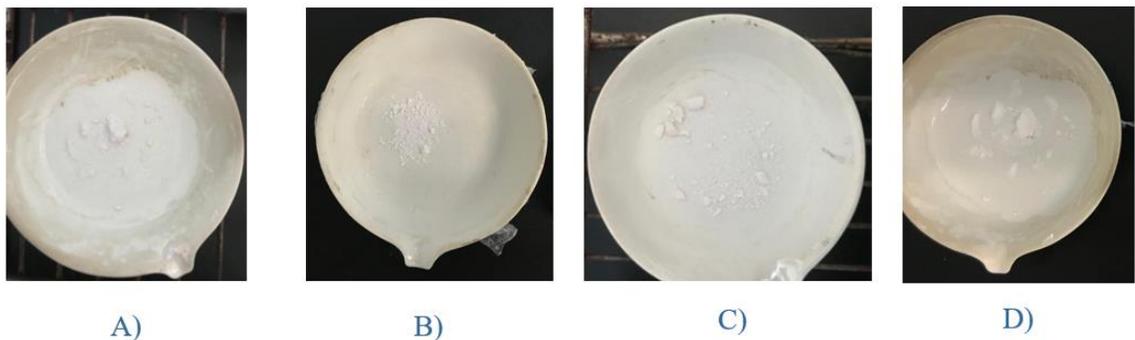


Figura 9. Productos obtenidos tras el tratamiento térmico de 1 hora. A) Réplica no.1; B) Réplica no.2; C) Réplica no.3; D) Control negativo.

2.2. Diseño Experimental

A continuación, se presenta el diseño experimental correspondiente a cada replica por tratamiento térmico. Cabe destacar que se consideró un exceso para la cantidad de agua destilada y H_3PO_4 añadido.

Tabla 2. Diseño experimental para el lote a tratamiento térmico de 500°C.

EXPERIMENTO 1 (500°C)				
	Espinas molidas (mg)	CaO (mg)	AGUA DESTILADA (mL)	H ₃ PO ₄ (μL)
RÉPLICA 1	800	145	5	70
RÉPLICA 2		145	5	70
RÉPLICA 3		145	5	70
CONTROL -		145	5	0
CONTROL +	HA comercial			

Tabla 3. Diseño experimental para el lote a tratamiento térmico de 600°C.

EXPERIMENTO 2 (600°C)				
	Espinas molidas (mg)	CaO (mg)	AGUA DESTILADA (μL)	H ₃ PO ₄ (μL)
RÉPLICA 1	1006.8	172	5	110
RÉPLICA 2		172	5	110
RÉPLICA 3		172	5	110
CONTROL -		172	5	0
CONTROL +	HA comercial			

Tabla 4. Diseño experimental para el lote a tratamiento térmico de 700°C.

EXPERIMENTO 3 (700°C)				
	Espinas molidas (mg)	CaO (mg)	AGUA DESTILADA (mL)	H ₃ PO ₄ (μL)
RÉPLICA 1	1.4563	266	5	170
RÉPLICA 2		266	5	170

RÉPLICA 3		266	5	170
CONTROL		266	5	0
-				
CONTROL	HA comercial			
+				

2.3. Balance De Materia

Se determinó el balance de materia en masa para cada una de las reacciones involucradas en el proceso de síntesis, donde:

COMPUESTO \equiv Especie química (Reactivo ó Producto)

ENTRADA \equiv Materia de entrada en gramos

GENERACIÓN \equiv Síntesis de alguna especie reactiva en gramos

SALIDA \equiv Materia de salida en gramos

CONSUMO \equiv Consumo de alguna especie reactiva en gramos

Dicho balance se realizó para cada lote de tratamiento térmico siguiendo la estequiometria de las siguientes reacciones, sin considerar exceso de ningún reactante.

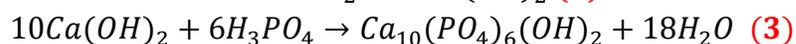
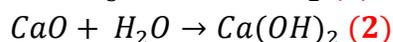


Tabla 5. Balance de materia en gramos para cada reacción involucrada en el lote de tratamiento térmico a 500°C.

500°C HA (mg)					
	COMPUESTO	ENTRADA	GENERACION	SALIDA	CONSUMO
REACCIÓN 1	CaCO ₃	200	0	0	200
	CaO	0	145	145	0
	CO ₂	0	55	55	0
REACCIÓN 2	CaO	145	0	0	145
	H ₂ O	46.5	0	0	46.5
	Ca (OH) ₂	0	191.5	191.5	0
REACCIÓN 3	Ca (OH) ₂	191.5	0	0	191.5
	H ₃ PO ₄	117.46	0	0	117.46
	Ca (PO ₄) ₆ (OH) ₂	0	143.3	143.3	0

	H ₂ O	0	165.66	165.66	0
--	------------------	---	--------	--------	---

Tabla 6. Balance de materia en gramos para cada reacción involucrada en el lote de tratamiento térmico a 600°C.

600°C HA (mg)					
	COMPUESTO	ENTRADA	GENERACIÓN	SALIDA	CONSUMO
REACCIÓN 1	CaCO ₃	335.6	0	0	335.6
	CaO	0	172.2	172.2	0
	CO ₂	0	163.3	163.3	0
REACCIÓN 2	CaO	172.2	0	0	172.2
	H ₂ O	55.2	0	0	55.2
	Ca (OH) ₂	0	227	227	0
REACCIÓN 3	Ca (OH) ₂	227	0	0	227
	H ₃ PO ₄	180.5	0	0	180.5
	Ca (PO ₄) ₆ (OH) ₂	0	237	237	0
	H ₂ O	0	170.5	170.5	0

Tabla 7. Balance de materia en gramos para cada reacción involucrada en el lote de tratamiento térmico a 700°C.

700°C(mg)					
	COMPUESTO	ENTRADA	GENERACION	SALIDA	CONSUMO
REACCIÓN 1	CaCO ₃	364	0	0	364
	CaO	0	266	266	0
	CO ₂	0	98	98	0
REACCIÓN 2	CaO	266	0	0	266
	H ₂ O	85	0	0	65
	Ca (OH) ₂	0	351	351	0
REACCIÓN 3	Ca (OH) ₂	351	0	0	331
	H ₃ PO ₄	278	0	0	278
	Ca (PO ₄) ₆ (OH) ₂	0	287	287	0
	H ₂ O	0	342	342	0

2.4. Balance De Energía

Se determinó la energía necesaria para llevar a cabo la síntesis de HA durante la tercera reacción para los tres tratamientos térmicos. Para esto, se consideró temperatura ambiente como temperatura inicial, mientras que la temperatura final corresponde a 35°C, temperatura a la cual se deja reaccionando el Hidróxido de Calcio con la solución de Ácido

fosfórico durante 18 h. El valor de la capacidad calorífica de la hidroxiapatita fue tomado de (Egan, Wakefield, & Elmore, 1950).

$$Cp = 770.14888 \frac{J}{g * K}$$

$$\Delta H = m \int_{T_o}^{T_f} Cp dT$$

Donde:

$\Delta H \equiv$ Entalpía (Joules)

$m \equiv$ masa (gr)

$Cp \equiv$ Capacidad calorífica a presión constante

$dT \equiv$ Diferencial de temperatura (K)

- Para el lote de tratamiento a 500 °C

$$\Delta H = m \int_{T_o}^{T_f} Cp dT$$

$$\Delta H = m Cp \int_{T_o}^{T_f} dT$$

$$\Delta H = m Cp [T]_{T_o}^{T_f}$$

$$\Delta H = (260 \times 10^{-3} g) (770.14888 \frac{J}{g * K}) [15 K]$$

$$\underline{\Delta H = 3.003 KJ}$$

- Para el lote de tratamiento a 600 °C

$$\Delta H = (322.5 \times 10^{-3} g) (770.14888 \frac{J}{g * K}) [15 K]$$

$$\underline{\Delta H = 3.725 KJ}$$

- **Para el lote de tratamiento a 700 °C**

$$\Delta H = (353 \times 10^{-3} \text{ g}) (770.14888 \frac{\text{J}}{\text{g} * \text{K}}) [15 \text{ K}]$$

$$\underline{\Delta H = 4.077 \text{ KJ}}$$

2.5. Caracterización

El estudio de la composición, morfología y cristalinidad es fundamental para materiales con aplicaciones para fines clínicos, por lo que cualquier HAp debe tener propiedades cercanas a las que pertenecen a la fase mineral del tejido óseo del huésped (Londoño-Restrepo, Millán-Malo, del Real-López, & Rodríguez-García, 2019). Para esto, se procedió a analizar el producto obtenido mediante las siguientes técnicas de caracterización: Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR), Difracción de Rayos X (DRX) y Microscopia Electrónica de Barrido - Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersa (SEM-EDS)

2.5.1. Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)

Con objeto de identificar los grupos funcionales presentes en el producto obtenido, se realizaron espectros IR en un espectrofotómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier registrando un barrido de 4000 a 450 cm^{-1} . Los datos obtenidos fueron analizados con un software denominado Origin.

2.5.2. Difracción de Rayos X (DRX)

Esta técnica se utilizó para identificar la cristalinidad y tamaño de los productos obtenidos.

2.5.3. Microscopia Electrónica de Barrido - Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersa (SEM-EDS)

La morfología de la estructura y análisis cualitativo elemental fueron analizados por un Microscopio de Barrido Electrónico que adicionalmente se encuentra acoplado con un sistema de Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersa.



CAPÍTULO III
RESULTADOS Y
DISCUSIONES



CAPÍTULO III

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 *Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)*

Tal como se menciona en la reacción química de la sección 1.5, la calcita (CaCO_3) perteneciente de las espinas de erizo de mar *S. Purpuratus* fueron convertidas en Óxido de Calcio (CaO) tras el tratamiento térmico de 800°C , como se observa en la figura 10. De esta transformación, suele constituirse una pérdida del 55% en el volumen total de calcita, además de la formación de macroporos en el material, según lo reportado en (Addadi & Weiner, 1985). El enlace Ca-O se muestra a 3635 y 712 cm^{-1} (Raizada, Shandilya, Singh, & Thakur, 2017) mientras que los picos a 1410 cm^{-1} y 870 cm^{-1} corresponden a enlaces C-O (Abdolmohammadi et al., 2012; Raizada et al., 2017). Estos últimos picos se pueden deber a la incompleta combustión de CaCO_3 , ya que como lo menciona (Shavandi, Bekhit, Ali, & Sun, 2015b), al aumentar la temperatura de calcinación a 900°C se obtiene CaO puro.

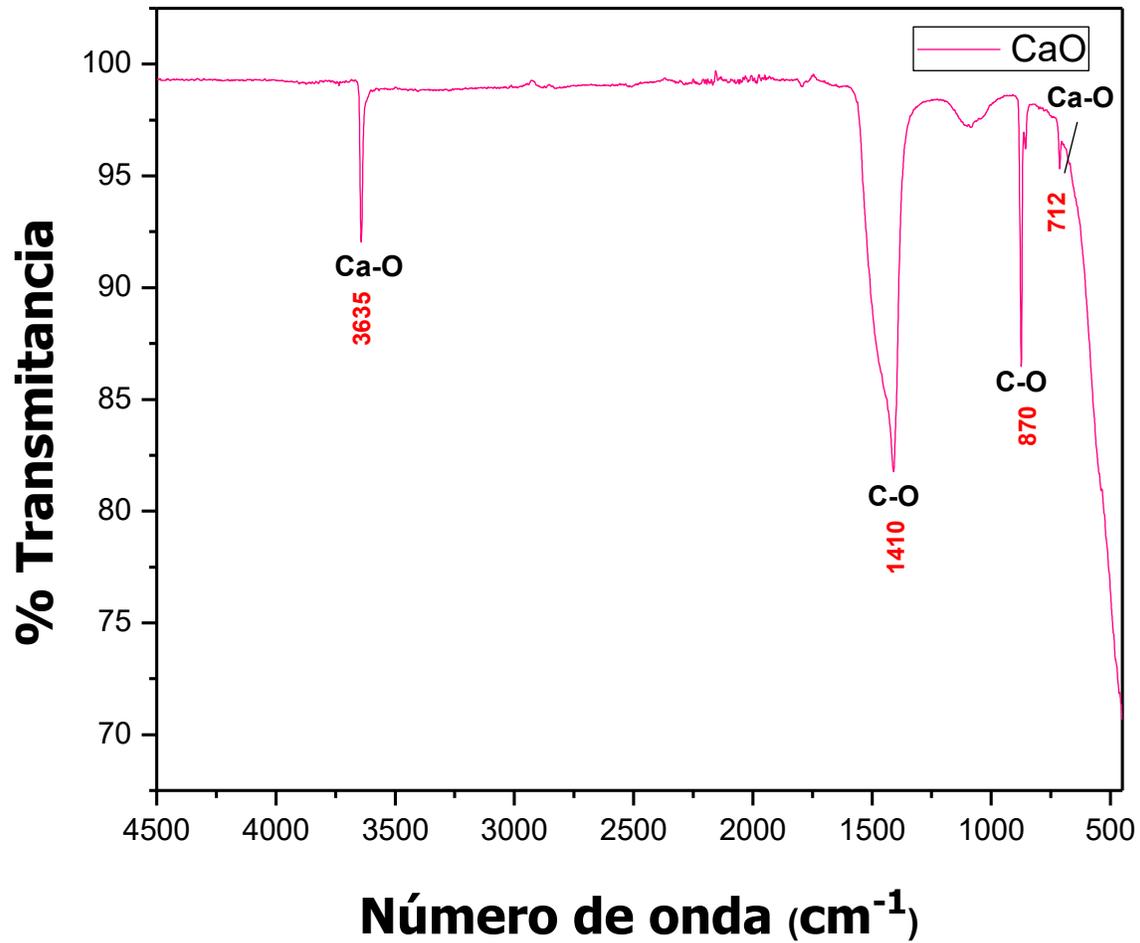


Figura 10. Espectro de FTIR obtenido para CaO.

De la bibliografía fue tomado el espectro FTIR para el control positivo, el cual constó de HA comercial (Bouropoulos, Stampoulakis, & Mouzakis, 2011) tal como se muestra en la figura 11. A 1035, 960, 601 y 561 cm^{-1} se muestra los picos característicos del grupo PO_4^{3-} . Mientras que a 3573 y 635 cm^{-1} aparece en enlace de vibración de OH.

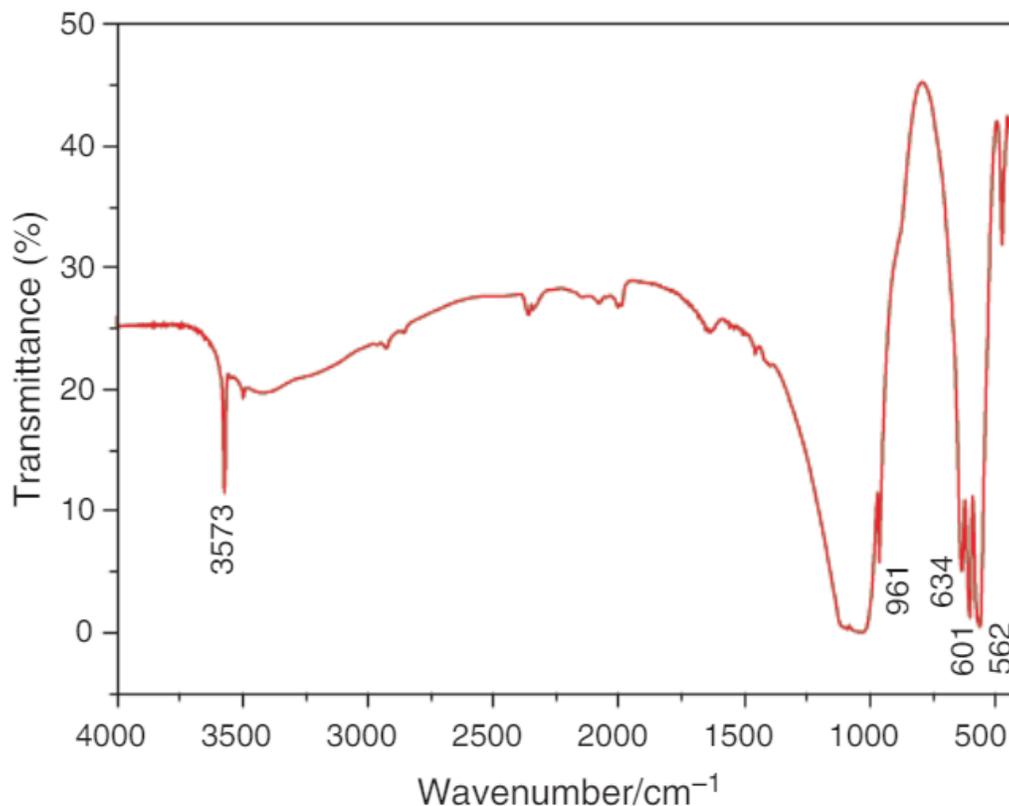


Figura 11. Control positivo, HA comercial (Bouropoulos, Stampolakis, & Mouzakis, 2011).

Por otro lado, para confirmar que el proceso para la obtención de HA fue exitoso, y que ninguna variable haya afectado los resultados, se realizó un control negativo. Tal como se muestra en la figura 12, se ve la presencia del enlace C-O en 1395 cm^{-1} (Raizada et al., 2017), así como el enlace Ca-O a 712 cm^{-1} y 870 cm^{-1} (Namduri & Nasrazadani, 2008; Raizada et al., 2017). Así mismo, no se ve evidencia de enlaces desde 555 a 711 cm^{-1} , ni a 630 cm^{-1} , mismos que son característicos del grupo fosfato (Michał, Ewa, & Tomasz, 2015; Sabu, Logesh, Rashad, Joy, & Balasubramanian, 2019a) y del grupo OH en HA comercial (Shavandi et al., 2015b), respectivamente. Además, no se encontraron bandas pertenecientes a grupos CO_2 , las cuales aparecen a 1406 cm^{-1} y 1478 cm^{-1} lo que indica que no hubo absorción desde el ambiente por parte de las muestras (Shavandi et al., 2015b).

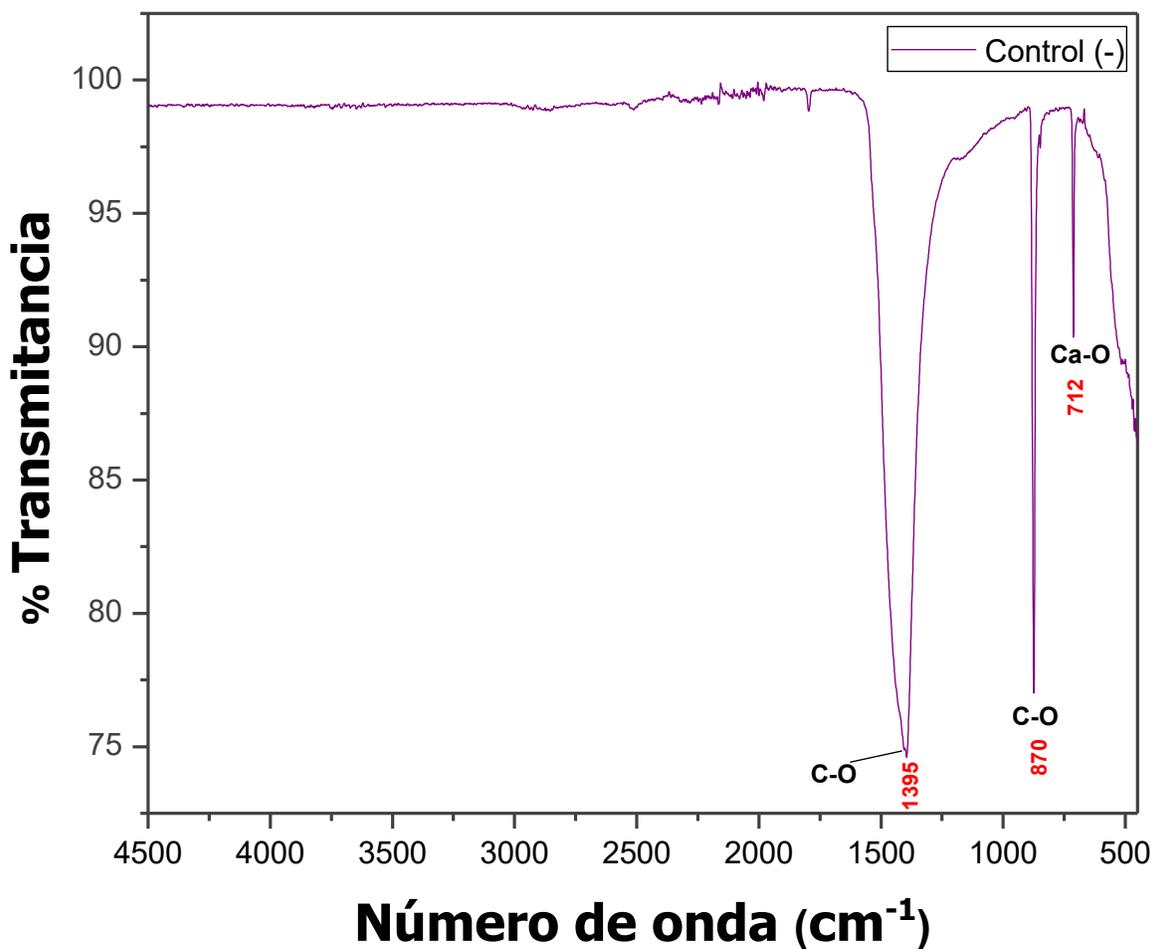


Figura 12. Espectro de FTIR obtenido del control negativo.

Como se observa en la figura 13, las bandas de alrededor de 600 y 555 cm⁻¹ se atribuyen al modo de flexión de los enlaces fosfato (Michał et al., 2015; Sabu et al., 2019a; Shavandi et al., 2015b), mientras que la banda de 1028 cm⁻¹ corresponde al modo de estiramiento asimétrico del fosfato y es una indicación de la formación de hidroxiapatita (Sabu et al., 2019a; Shavandi et al., 2015b). La banda a 630 cm⁻¹ pertenece a los modos de flexión del grupo hidroxilo de HA (Sabu et al., 2019a). Las bandas a 1412 cm⁻¹ indican la presencia de contaminación residual del grupo carbonato (CO₃²⁻), correspondiente al modo de vibración ν_2 (Sivakumar, Kumar, Shantha, & Rao, 1996), mismo que surge debido a la

absorción de dióxido de carbono de la atmósfera circundante durante la síntesis y es reportado por varios autores (Shavandi, Bekhit, Ali, & Sun, 2015a) . No obstante, el carbonato que contiene HA es químicamente similar a la apatita biológica que se encuentra en los huesos y se informa que tiene una alta bioactividad (Sabu, Logesh, Rashad, Joy, & Balasubramanian, 2019b).

Por otro lado, la banda a 712 cm^{-1} corresponde al enlace Ca-O (Namduri & Nasrazadani, 2008; Raizada et al., 2017; Vecchio et al., 2007), el cual puede resultar de una pequeña cantidad de CaCO_3 presente en los productos (Vecchio et al., 2007) o debido a la descomposición de HA por deshidratación, según lo reportado por (Shih, Chen, Wang, & Hon, 2004).

No hay rastros de agua absorbida por la muestra, dado que estos enlaces (OH) aparecen a 1651 cm^{-1} cuando hay flexión y $\sim 3460\text{ cm}^{-1}$ cuando hay estiramiento (Vecchio et al., 2007).

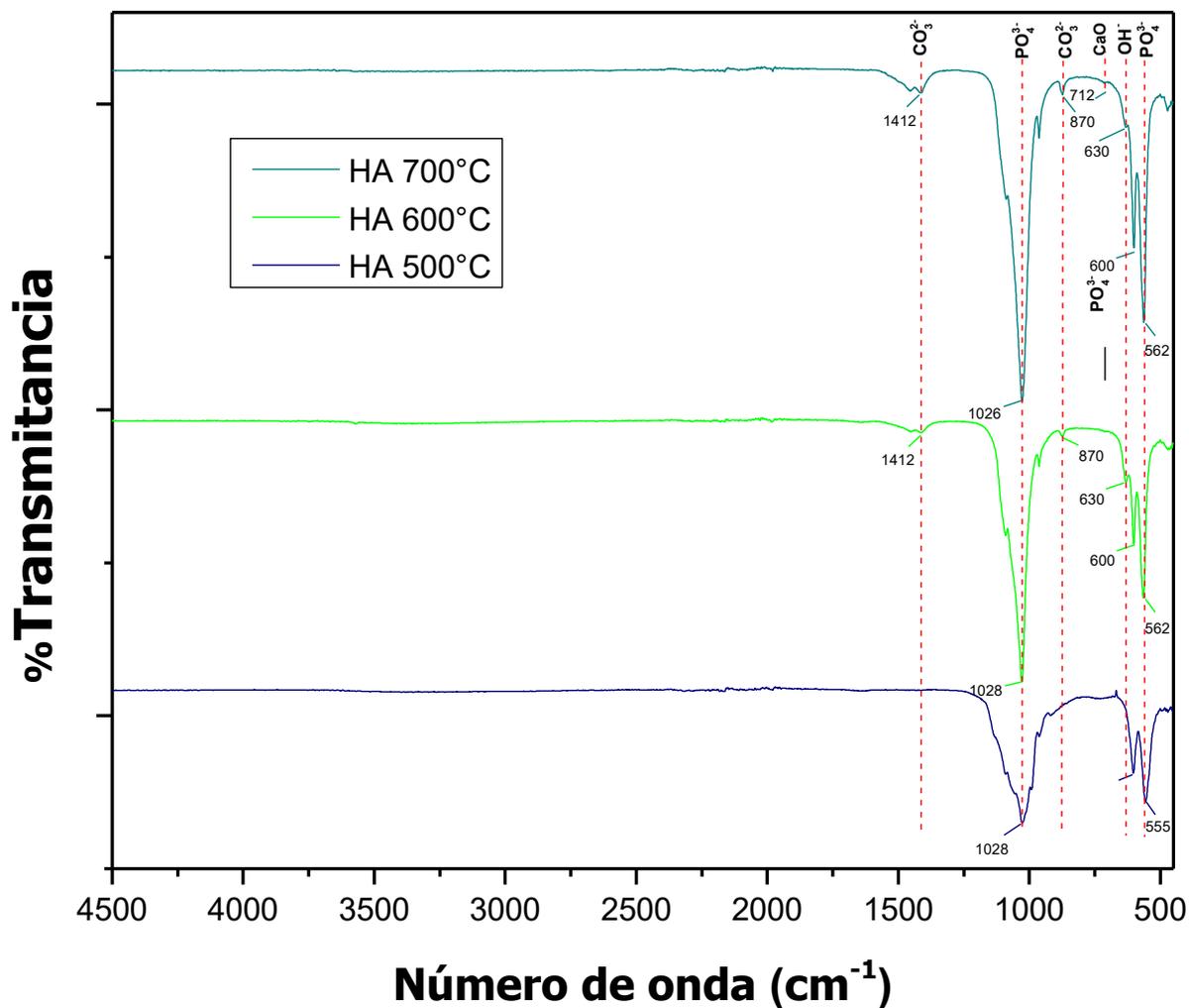


Figura 13. Espectro FTIR de los tres materiales sintetizados a diferentes temperaturas.

3.2 Difracción de Rayos X (DRX)

3.2.1 Difractograma

La figura 14 muestra los patrones de DRX para los productos obtenidos tras la calcinación durante 1 hora a 500, 600 y 700°C. Los planos cristalinos de HAp se encontraron de acuerdo con la tarjeta ICDD 9-432, en todos los casos sin dependencia de la temperatura. Cuando los polvos cristalinos se calientan a 700°C, se observa la aparición del plano

cristalino (212) correspondiente a cristales de CaO(Ramesh, Tan, Hamdi, Sopyan, & Teng, n.d.), mismo que no se encuentra presente a 500°C ni 600°C. Esto se puede deber a la deshidroxilacion de la Hidroxiapatita, provocando la aparición de moléculas de CaO. Por otro lado, se observa menor cristalinidad del polvo a 700°C debido al ensanchamiento de los picos pertenecientes a los planos cristalinos (002) y (211).

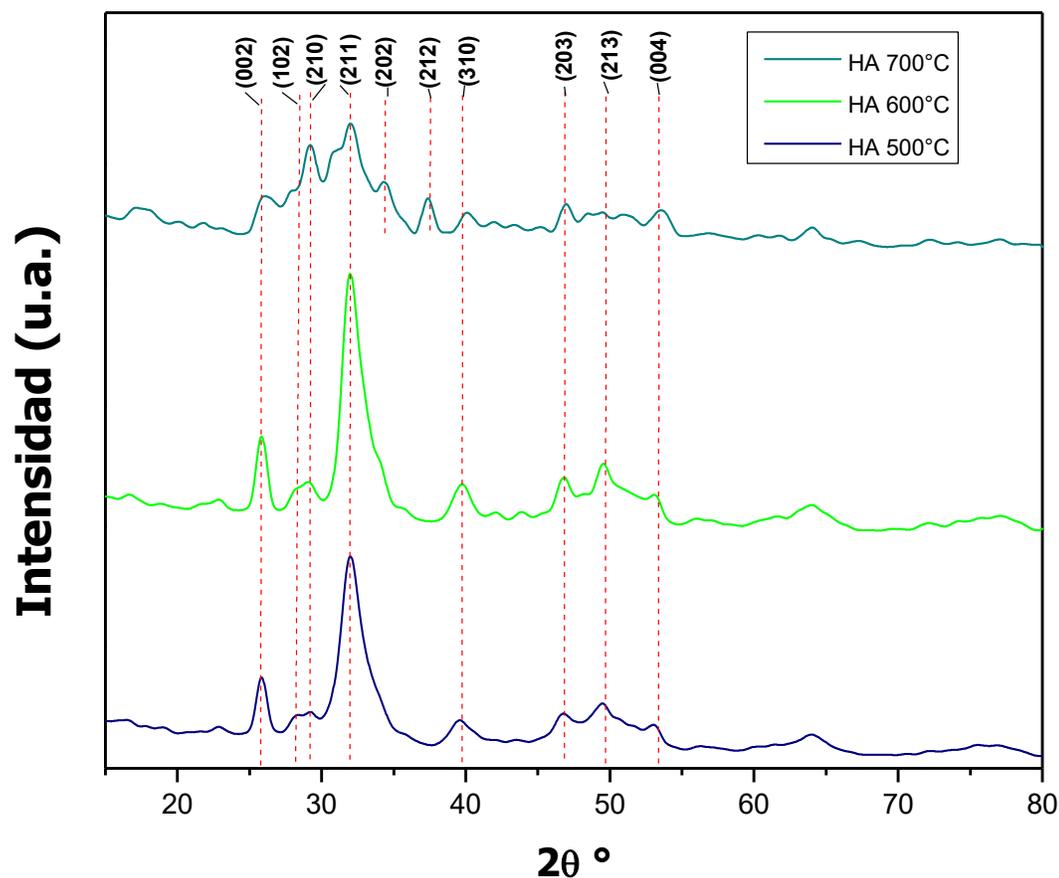


Figura 14. Espectro de DRX obtenido para los tres materiales sintetizados a distintas temperaturas.

3.2.2 Tamaño promedio de cristales

Por otro lado, se determinó el tamaño de partícula utilizando la ecuación de Scherrer y el difractograma de cada material. Se tomaron los tres picos de mayor intensidad para cada difractograma y tras los cálculos matemáticos, se realizó un diagrama de caja y bigotes usando el software Origin. Los resultados se muestran en la figura 15.

De la tabla 5 se puede observar que el tamaño de partícula para el producto obtenido a 600°C, 500 y 700°C fue mayor, intermedio y menor, respectivamente.

Según lo reportado por (Shih, Wang, Wang, & Hon, 2006), el tamaño de los cristales tiende a aumentar con el tiempo de calentamiento, mas no por el aumento o disminución de la temperatura. Sin embargo, en lo reportado por (Latocha, Wojasiński, Sobieszuk, Gierlotka, & Ciach, 2019) se obtuvieron partículas de HA más pequeñas al incrementar la temperatura, similar a los resultados obtenidos en este estudio, y esto se puede deber al aumento de solubilidad, desaglomeración de las fases (Ungureanu, D. et al., 2015) y al aumento de la cinética de reacción de la formación de HAp (Latocha et al., 2019).

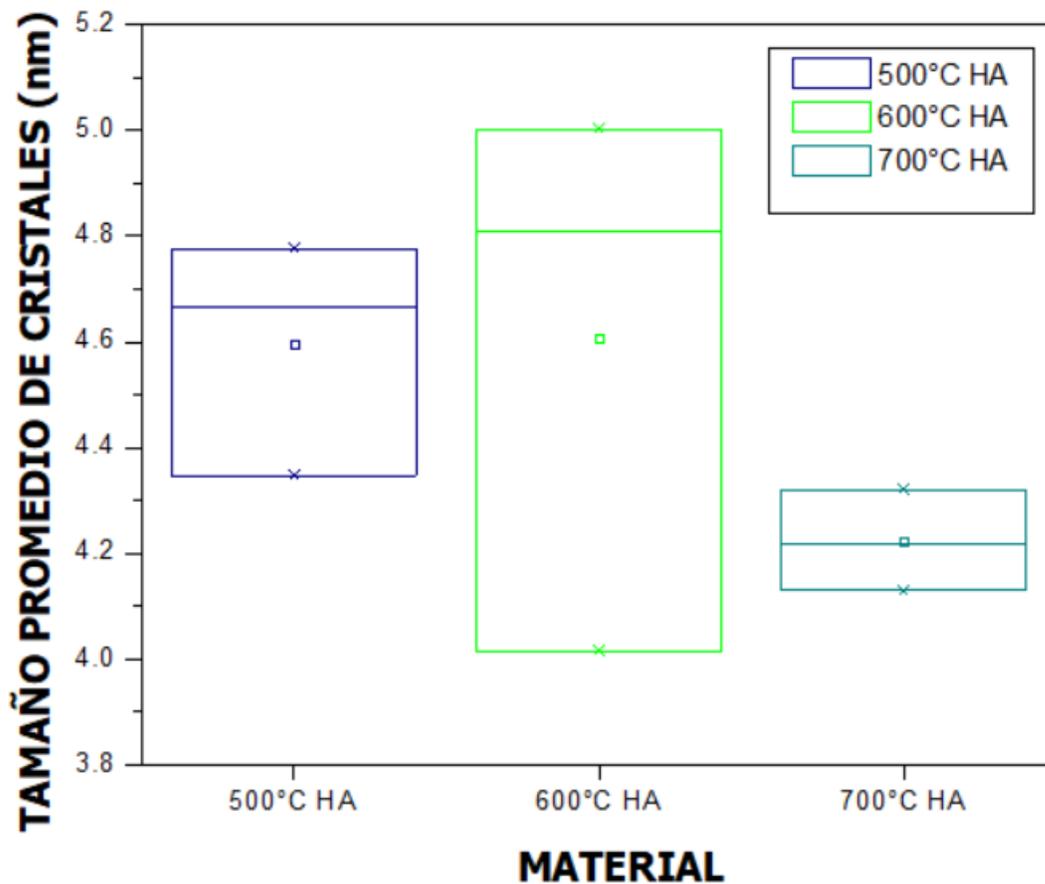


Figura 15. Diagrama de caja y bigotes del tamaño promedio de cristales obtenidos para cada material sintetizado.

Tabla 8. Tamaño promedio de cristales para cada HA sintetizada.

ESTADÍSTICO PRODUCTO	MEDIA (nm)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR(\pm nm)
500°C HA	4.59603333	0.222587092
600°C HA	4.60843333	0.523143052
700°C HA	4.2226	0.095805898

3.3 Microscopia Electrónica de Barrido - Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersa (SEM-EDS)

3.3.1 Morfología

Los estudios de morfología observadas mediante SEM para el producto a 500, 600 y 700°C, se muestran en las figuras 16, 17 y 18, respectivamente.

Para el caso del producto a 500°C se observan aglomeraciones de distintos tamaños, los cuales van de entre 3 y 6 micrómetros, como se observa en la figura 16. En cuanto al producto obtenido a 600°C mostrado en la figura 17, se observa una distribución heterogénea, con aglomeraciones de tamaño variable y forma laminar. Finalmente, para el caso del producto a 700°C presente en la figura 18, se aprecian aglomeraciones de distintos tamaños, los cuales van desde 4 hasta 10 micrómetros.

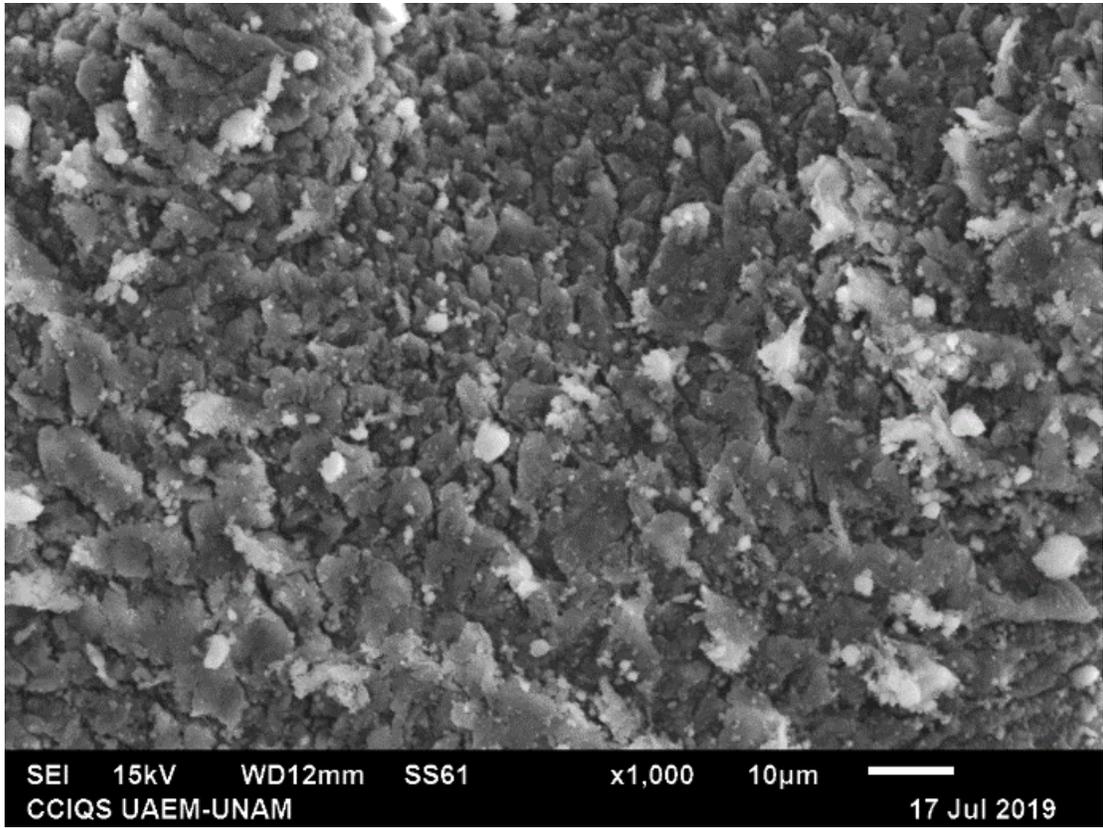


Figura 16. Imagen obtenida mediante SEM para el material sintetizado a 500°C.

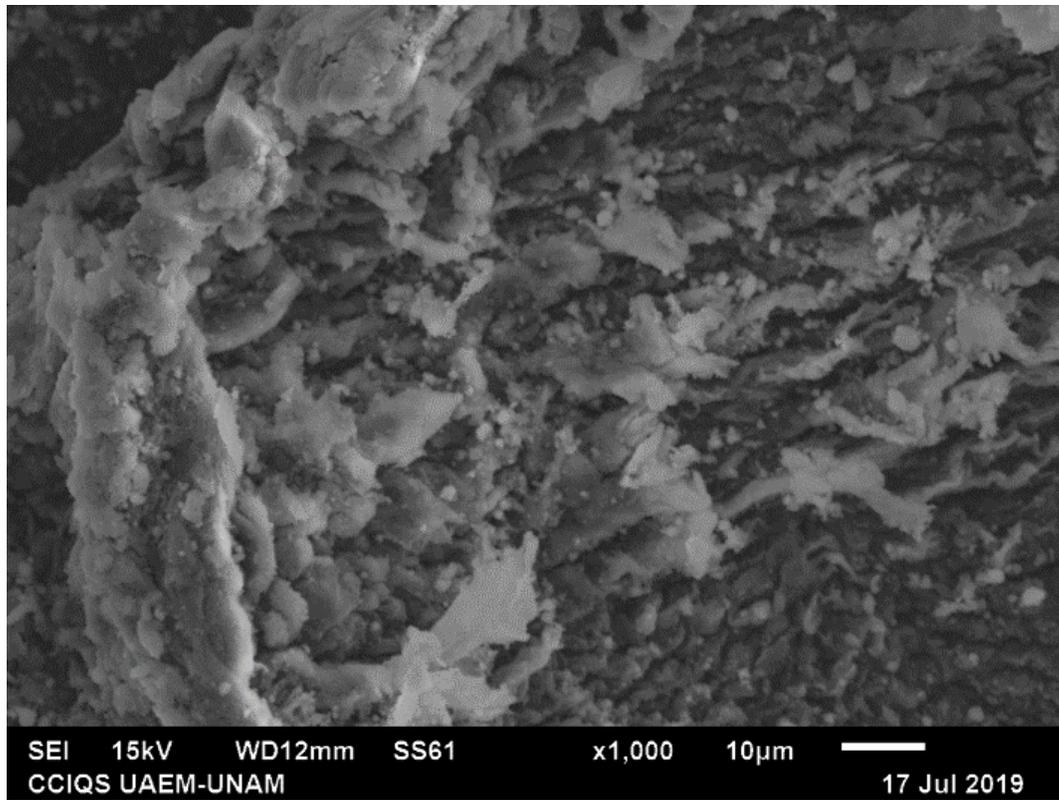


Figura 17. Imagen obtenida mediante SEM para el material sintetizado a 600°C.

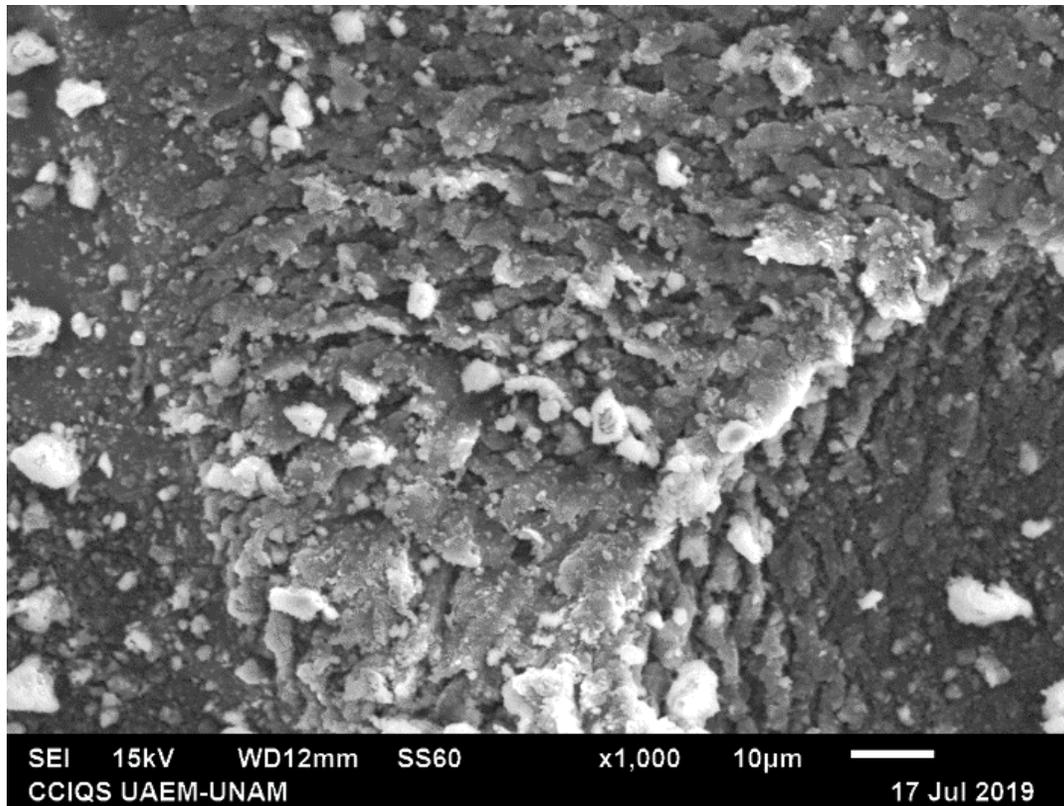


Figura 18. Imagen obtenida mediante SEM para el material sintetizado a 700°C.

3.3.2 Composición Química Elemental

Se determinó la composición química elemental de la Hidroxiapatita obtenida en los tres tratamientos térmicos mediante Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersa (EDS). Para el caso del producto obtenido a 500°C se observa presencia de Mg, F, C, O, como se observa en la figura 19. Por otro lado, para el caso de los productos a 600°C y 700°C mostrados en la figura 20 y 21, respectivamente, solo hay presencia de Ca y P. Vale la pena destacar, que esta técnica conlleva un error de medición de 5%.

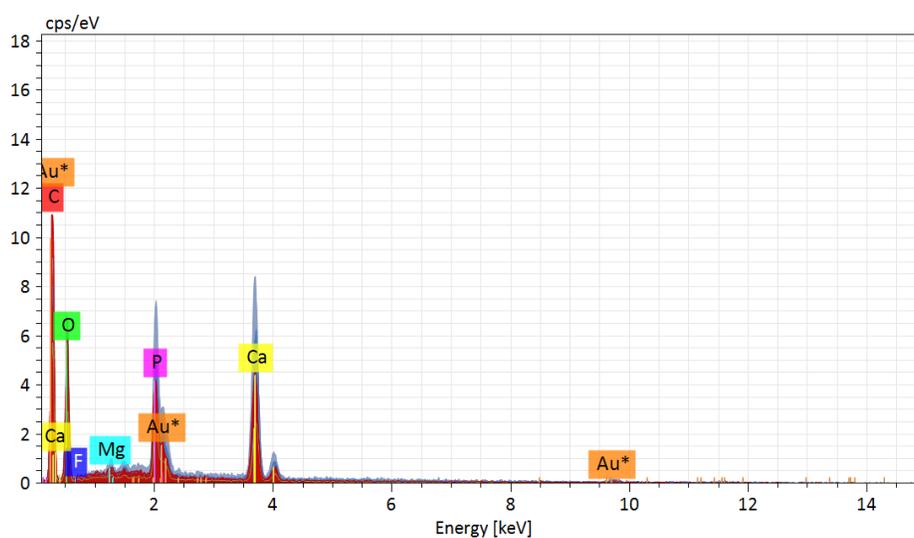


Figura 19. Espectro obtenido mediante EDS para el material sintetizado a 500°C.

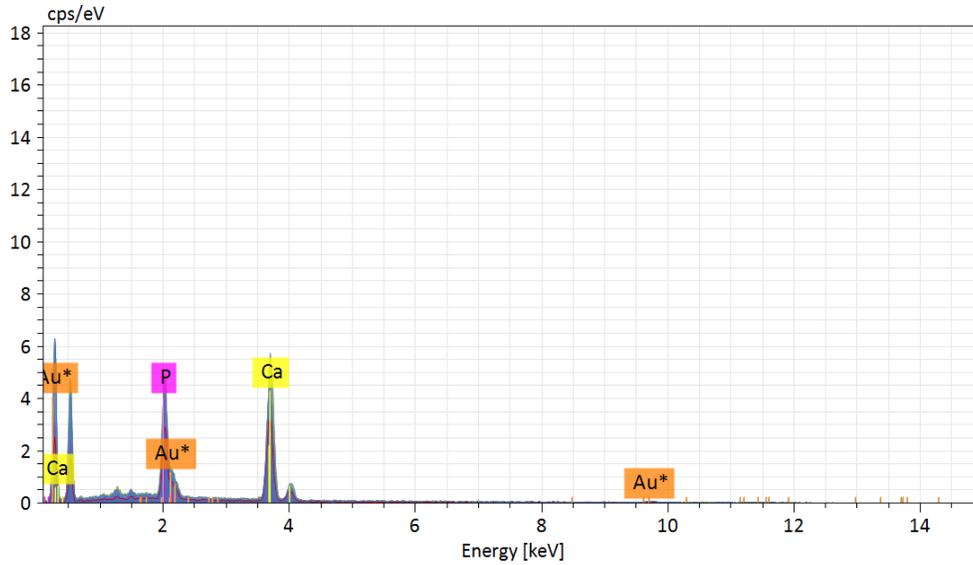


Figura 20. Espectro obtenido mediante EDS para el material sintetizado a 600°C.

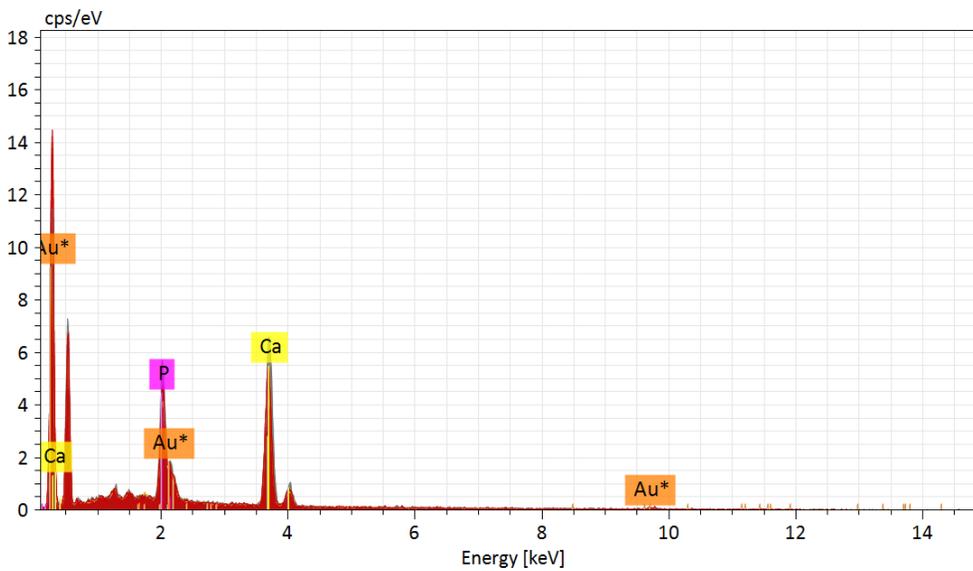


Figura 21. Espectro obtenido mediante EDS para el material sintetizado a 700°C.

3.3.3 Relación Ca/P

Además, se determinó la relación Ca/P a partir de los datos de concentración atómica obtenidos por Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersa (EDS). Dichos datos fueron

trasladados al Software Origin y analizados mediante un diagrama de caja y bigotes, como se muestra en la figura 22.

La relación Ca/P fue significativamente mayor para la HA obtenida a 700°C, siguiendo con la HA obtenida a 500°C y finalmente, la menor relación Ca/P se obtuvo a 600°C.

Según lo reportado por (Dorozhkin, 2010) , la fuerza del material aumenta con el aumento de la relación Ca / P, alcanzando el valor máximo alrededor de Ca / P ~1.67 (HA estequiométrica) y disminuye repentinamente cuando Ca / P > 1.67. Así mismo, Según la teoría de Weibull para materiales frágiles, la resistencia se ve disminuida al aumentar el tamaño de la muestra(Lauer, Schmier, Speck, & Nickel, 2018). Por lo tanto, la HA obtenida en este estudio a 500°C podría ser la más fuerte, mientras que la obtenida a 700°C podría ser la más frágil. No obstante, también debe considerarse la porosidad, ya que al cambiar la geometría de los poros es posible influir en la resistencia de las biocerámicas porosas (Dorozhkin, 2010; Sivakumar, Sampath Kumar, et al., 1996).

Por otro lado, autores encontraron que para HA rico en calcio (Ca/P>1.67) suele aparecer oxido de calcio (CaO) (Ramesh, Tan, Hamdi, Sopyan, & Teng, 2007), lo cual se comprueba al comparar dicha relación de los datos obtenidos en este estudio a 700°C , presentes en la tabla 6, contra su respectivo espectro FTIR en la figura 13.

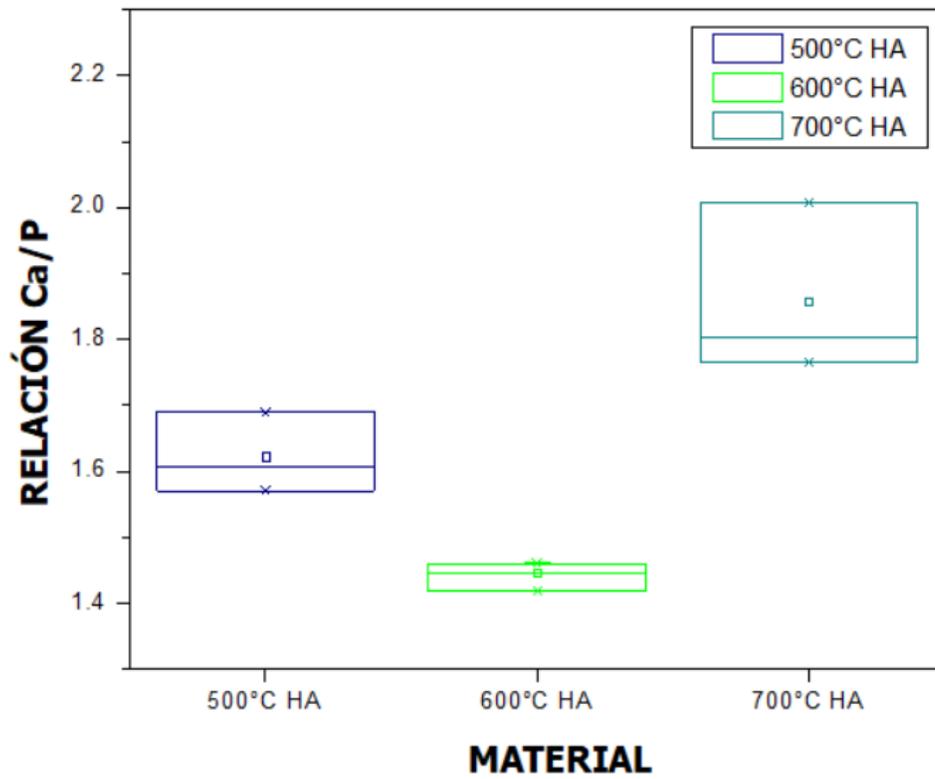


Figura 22. Diagrama de caja y bigotes de la relación Ca/P obtenido para cada material sintetizado.

Tabla 9. Relación Ca/P promedio para cada material sintetizado.

ESTADÍSTICO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
PRODUCTO		
500°C HA	1.62146103	0.06115839
600°C HA	1.44573525	0.01977987
700°C HA	1.85469597	0.1303317



CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES



CAPÍTULO IV

IV. CONCLUSIONES

Los análisis de FTIR demuestran que, la banda perteneciente al grupo OH se localiza únicamente a 630 cm^{-1} . Por lo tanto, los resultados en este estudio comparados con información encontrada en la literatura, revelan que la fase cristalina de HA obtenida a las tres temperaturas podría corresponder a una fase nanocristalina de la Hidroxiapatita (Pasteris et al., 2004), la cual, incluye la misma disposición de planos atómicos así como las mismas unidades moleculares. Sin embargo, autores atribuyen el bajo grado de presencia del grupo OH a la presencia de CO_3^{2-} asignada en la banda $\approx 870\text{ cm}^{-1}$ (Rey, Collins, Goehl, Dickson, & Glimcher, 1989) a los cuales denominan sustituciones de tipo A (Elliott, 2008). No obstante, para tener mayor certeza de este suceso, será necesaria la monitorización de fases utilizando alguna técnica alternativa, tal como HRTEM, TGA o Raman. Por otro lado, se menciona que, al ser calentadas las muestras en intervalos hasta 1000°C es posible aumentar la intensidad de las bandas OH (Elliott, 2008; Pasteris et al., 2004). Por lo que este factor podría considerarse en trabajos futuros.

Basado en resultados obtenidos por el ancho de los picos de DRX, se observó que los cristales de HA obtenidos en este estudio tienen tamaño promedio que va desde 4.22 nm hasta 4.60 nm , observándose que el menor tamaño de partícula corresponde al material con mayor temperatura del tratamiento térmico, por lo que se puede concluir que, características propias del material se verán relacionadas con la temperatura de síntesis, por lo que es posible aceptar la hipótesis planteada en este estudio.

Aunado a lo anterior mencionado, y a la baja hidroxilación de los cristales, se puede tener un primer acercamiento a la función biológica que tendría el material en el hueso, ya que, como se menciona en, (Rutherford & Van Staden, 1996; Vann et al., 2017) los cristales con estas condiciones otorgan a la fase mineral la solubilidad necesaria para la resorción del hueso por los osteoclastos, función a la que se somete continuamente los huesos para su reparación y remodelación. Así mismo, debido a su bajo espesor, probablemente

podiera evitar la propagación de grietas (Jaime Gómez, Michele, José, Stephanie, & Christophe, 2013)

En cuanto a los datos obtenidos mediante EDS referente a la relación Ca/P, se encontró que la concentración de iones de Ca es mayor para el material sometido a 700°C, obteniéndose una relación Ca/P de 1.8546 ± 0.13 . La causa de esto se puede deber a la deshidroxilación de la HA (Shih et al., 2004), resultando CaO en el material, misma información que aparece en el difractograma de HA a 700°C en el plano (212) y en el espectro FTIR de HA a 700°C con número de onda 712 cm^{-1} .

Por otro lado, los resultados de morfología muestran aglomeraciones para cualquiera de los tres materiales sintetizados. Sin embargo, para el caso de la HA sintetizada a 700°C, se muestran formas más definidas.

Al analizar los resultados obtenidos en el balance de energía, se puede observar que, la energía total para cada lote aumentó con respecto a la cantidad de hidroxiapatita obtenida, así mismo, dicha entalpía resultó con signo positivo, por lo que se puede concluir que, la cantidad de energía absorbida por la hidroxiapatita será mayor cuando su masa aumente.

Finalmente, es importante mencionar que fue aprovechado un material de desecho para producir un material con potencial en la industria médica. De esta forma se trabaja en la reducción de contaminantes al mismo tiempo que se busca una alternativa valiosa en la industria de los biomateriales.



CAPÍTULO V

REFERENCIAS



CAPÍTULO V

V. REFERENCIAS

1. **Alexander, S. et al. (2007)**. Obtención de hidroxiapatita para injerto óseo por el método de precipitación. VI (2) pp. 41-48
2. **Alvarez, J. (2009)**. Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción. Rev. Est. Transd. 1 (2).
3. **Aparicio, M et al. (2010)**. Utilidad de la difracción de rayos X en las nanociencias. Rev. Mun. Nan. UNAM. 3(2). Pp. 62-72.
4. **Abdolmohammadi, S., Siyamak, S., Ibrahim, N. A., Yunus, W. M. Z. W., Rahman, M. Z. A., Azizi, S., & Fatehi, A. (2012)**. Enhancement of Mechanical and Thermal Properties of Polycaprolactone/Chitosan Blend by Calcium Carbonate Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(4), 4508–4522. <https://doi.org/10.3390/ijms13044508>
5. **Addadi, L., & Weiner, S. (1985)**. Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.12.4110>
6. **Ahmed, P. (n.d.)**. Effect of Sintering Temperature on Some Physical And Mechanical Properties of Fabricated Hydroxyapatite Used For Hard Tissue Healing. *Engineering and Technology Journal*. Retrieved from https://www.academia.edu/32806669/Effect_of_Sintering_Temperature_on_Some_Physical_And_Mechanical_Properties_of_Fabricated_Hydroxyapatite_Used_For_Hard_Tissue_Healing
7. **Akram, M., Ahmed, R., Shakir, I., Ibrahim, W. A. W., & Hussain, R. (2014)**. Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources. *Journal of Materials Science*, 49(4), 1461–1475. <https://doi.org/10.1007/s10853-013-7864-x>
8. **Barrera, A. (2014)**. Materiales cerámicos avanzados con aplicaciones odontológicas obtenidos por sinterización de polvos mediante la técnica de microondas. Tesis de Grado. Universidad Politécnica de Valencia.
9. **Bermudez, P. (1981)**. Metodos de Difracción de Rayos X: Principios y aplicaciones.

10. **Biosynthesis and characterization of hydroxyapatite and its composite (hydroxyapatite-gelatin-chitosan-fibrin-bone ash) for bone tissue engineering applications.** (2019). *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 844–852. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.02.058>
11. **Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., ... Martin, F. L. (2014).** Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature Protocols*, 9(8), 1771–1791. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>
12. **Barakat, N. A. M., Khil, M. S., Omran, A. M., Sheikh, F. A., & Kim, H. Y. (2009).** Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods. *Journal of Materials Processing Technology*, 209(7), 3408–3415. <https://doi.org/10.1016/J.JMATPROTEC.2008.07.040>
13. **Birkner, Nancy, Wang, Q. (UCD). (2019).** How an FTIR Spectrometer Operates - Chemistry LibreTexts. Retrieved August 5, 2019, from [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/How_an_FTIR_Spectrometer_Operates](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/How_an_FTIR_Spectrometer_Operates)
14. **Borzęcka-Prokop, B., Weselucha-Birczyńska, A., & Koszowska, E. (2007).** MicroRaman, PXRD, EDS and microscopic investigation of magnesium calcite biomineral phases. The case of sea urchin biominerals. *Journal of Molecular Structure*, 828(1–3), 80–90. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2006.05.040>
15. **Bouropoulos, N., Stampoulakis, A., & Mouzakis, D. E. (2011).** Dynamic Mechanical Properties of Calcium Alginate-Hydroxyapatite Nanocomposite Hydrogels. *Science of Advanced Materials*.
16. **Chen, F. M., & Liu, X. (2016).** Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004>
17. **Coates, J., & Setti, L. (1986).** Infrared Spectroscopy as a Tool for Monitoring Oil Degradation. In *Aspects of Lubricant Oxidation* (pp. 57-57–22).

18. **Characterization of natural hydroxyapatite originated from fish bone and its biocompatibility with osteoblasts. (2018).** *Materials Science and Engineering: C*, 90, 706–712. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2018.04.026>
19. **Clavijo, J. (2013).** Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Rev. Elem.* (3), pp. 133-146
20. <https://doi.org/10.1520/STP18374S>
21. **Damien, E., & Revell, P. A. (n.d.).** Coralline hydroxyapatite bone graft substitute: A review of experimental studies and biomedical applications. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics : JABB*.
22. **Dorozhkin, S. V. (2010).** Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.050>
23. **Duraccio, D., Mussano, F., & Faga, M. G. (2015).** Biomaterials for dental implants: current and future trends. *Journal of Materials Science*, 50(14), 4779–4812. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9056-3>
24. **Egan, E. P., Wakefield, Z. T., & Elmore, K. L. (1950).** High-Temperature Heat Content of Hydroxyapatite. *Journal of the American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/ja01162a019>
25. **Elliott, J. C. (2008).** Calcium Phosphate Biominerals. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*. <https://doi.org/10.2138/rmg.2002.48.11>
26. **Forriol, F. (2005).** Los sustitutos óseos y sus posibilidades actuales. *Rev. Asoc. Arg. Ortop. Traumatol.* 70, pp. 82-93.
27. **Fuentes, M. et al. (2008).** Aplicación de la Espectroscopia del Infrarrojo Medio en Química Analítica de Procesos. *Rev. Biol. Soc. Quim. Mex.* 2(3). Pp. 93-103.
28. **Gallut, P. (2016).** Aislamiento y cultivo de microorganismos asociados a Oncoides de manantiales hidrotermales de Santispac, Bahía Concepción, B.C.S., México. Tesis de grado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. [Fecha de consulta: 5 de agosto de 2019]. Disponible en : https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/424/1/gallut_p.pdf
29. **Galvan, L. (2014)** Variación calcio-magnesio y densidad óptica en estructuras mandibulares de *Eucidaris thouarsii* en el Pacífico mexicano. Tesis de grado. CICESE.

30. **García, M. et al. (2006).** La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* [en línea] [Fecha de consulta: 5 de agosto de 2019] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43211937005>> ISSN 1405-888X
31. **Gasga, J. (2013).** Observación del esmalte dental humano con microscopía electrónica. *Rev. Tame.* 1(3), pp. 90-96.
32. **Goloshchapov, D. L., Kashkarov, V. M., Rumyantseva, N. A., Seredin, P. V., Lenshin, A. S., Agapov, B. L., & Domashevskaya, E. P. (2013).** Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by precipitation using hen's eggshell. *Ceramics International*, 39(4), 4539–4549. <https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2012.11.050>
33. **Hu, C. Y., & Yoon, T.-R. (2018).** Recent updates for biomaterials used in total hip arthroplasty. *Biomaterials Research*, 22, 33. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0144-8>
34. **Ipohorski, M. et al., (2013).** Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales. *Rev. Cienc. Inv.* 63 (3), pp. 43-53
35. **Juárez D. et al. (2012).** Estudio de materiales con cambio de fase (PCM) y análisis SEM de micro PCM. *3c Tecnología.* (3), pp. 54-77.
36. **Khoo, W., Nor, F. M., Ardhyanta, H., & Kurniawan, D. (2015).** Preparation of Natural Hydroxyapatite from Bovine Femur Bones Using Calcination at Various Temperatures. *Procedia Manufacturing*, 2, 196–201. <https://doi.org/10.1016/J.PROMFG.2015.07.034>
37. **Lam, M. T., & Wu, J. C. (2012).** Biomaterial applications in cardiovascular tissue repair and regeneration. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 10(8), 1039–1049. <https://doi.org/10.1586/erc.12.99>
38. **Lario-Femenía, J., Amigó-Mata, A., Vicente-Escuder, Á., Segovia-López, F., Amigó-Borrás, V., & Amigó-Borrás, V. (2016).** Desarrollo de las aleaciones de titanio y tratamientos superficiales para incrementar la vida útil de los implantes. *Revista de Metalurgia*, 52(4), 084. <https://doi.org/10.3989/revmetalm.084>
39. **Latocha, J., Wojasiński, M., Sobieszuk, P., Gierlotka, S., & Ciach, T. (2019).** Impact of morphology-influencing factors in lecithin-based hydroxyapatite precipitation. *Ceramics International*. <https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2019.07.103>
40. **Lauer, C., Schmier, S., Speck, T., & Nickel, K. G. (2018).** Strength-size relationships

in two porous biological materials. *Acta Biomaterialia*, 77, 322–332.
<https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2018.07.010>

41. **Lario, J., et al. (2016).** Desarrollo de las aleaciones de titanio y tratamientos superficiales para incrementar la vida útil de los implantes. *Rev. Metal.* 52 (4), Doi: <http://dx.doi.org/10.3989/revmetalm.084>
42. **LaVigne, M., Hill, T. M., Sanford, E., Gaylord, B., Russell, A. D., Lenz, E. A., ... Young, M. K. (2013).** The elemental composition of purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) calcite and potential effects of pCO₂; during early life stages. *Biogeosciences*, 10(6), 3465–3477. <https://doi.org/10.5194/bg-10-3465-2013>
43. **Lee, W.-H., Zavgorodniy, A. V., Loo, C.-Y., & Rohanizadeh, R. (2012).** Synthesis and characterization of hydroxyapatite with different crystallinity: Effects on protein adsorption and release. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100A(6), 1539–1549. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34093>
44. **Londoño-Restrepo, S. M., Millán-Malo, B. M., del Real-López, A., & Rodríguez-García, M. E. (2019).** In situ study of hydroxyapatite from cattle during a controlled calcination process using HT-XRD. *Materials Science and Engineering: C*. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110020>
45. **M., E. (2011).** Hydroxyapatite-Based Materials: Synthesis and Characterization. In *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*. <https://doi.org/10.5772/19123>
46. **Mancilla-Sanchez, E., Gómez-Gutiérrez, C. M., Guerra-Rivas, G., Soto-Robles, C. A., Vilchis-Nestor, A. R., Vargas, E., & Luque, P. A. (2019).** Obtaining hydroxyapatite from the exoskeleton and spines of the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *International Journal of Applied Ceramic Technology*. <https://doi.org/10.1111/ijac.13086>
47. **Michał, W., Ewa, D., & Tomasz, C. (2015).** Lecithin-based wet chemical precipitation of hydroxyapatite nanoparticles. *Colloid and Polymer Science*, 293(5), 1561–1568. <https://doi.org/10.1007/s00396-015-3557-0>
48. **Medina, J. et al., (2005).** La simetría molecular. Instituto Tecnológico de Aguascalientes. *Rev. Conc. Tec.* 27(30).
49. **Montero, L. (2012).** Métodos físico-químicos de caracterización de las fibras de polilactida. Tesis Doctoral. [Fecha de consulta: 5 de agosto de 2019]. Disponible en : <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/96986/TLMP1de1.pdf?sequence=1&isAllowe>

d=y

50. **Namduri, H., & Nasrazadani, S. (2008).** Quantitative analysis of iron oxides using Fourier transform infrared spectrophotometry. *Corrosion Science*. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2008.06.034>
51. **Nanoestructuras de hidroxiapatita, gran avance hacia la regeneración de huesos. (n.d.).** Retrieved July 31, 2019, from <http://w3.conricyt.mx/noticia-detalle.php?noti=534>
52. **Pasteris, J. D., Wopenka, B., Freeman, J. J., Rogers, K., Valsami-Jones, E., Van Der Houwen, J. A. M., & Silva, M. J. (2004).** Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: Implications for bone and biomaterials. *Biomaterials*. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00487-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00487-3)
53. **Perez, J., (s/a)** Difraccion de Rayos X. Introduccion.] [Fecha de consulta: 5 de agosto de 2019]. Disponible en : https://www.upct.es/~minaees/difraccion_rayosx.pdf
54. **Petrick, S. et al. (2005)** “Método de Rietveld para el estudio de estructuras cristalinas”. Revista de la Facultad de Ciencias de la UNI : REVCUNI. 9(1), pp. 1-5.
55. **Piqueras, J. et al., (s/a).** Principios básicos del Microscopio Electrónico de Barrido. [Fecha de consulta: 5 de agosto de 2019]. Disponible en : <https://core.ac.uk/download/pdf/61904764.pdf>
56. **Presenda, A. (2014).** Materiales cerámicos avanzados con aplicaciones odontológicas obtenidos por sinterización de polvos mediante la técnica de microondas. Universidad Politécnica de Valencia. Tesis de grado.
57. **Reyes, B. (2016).** “Efecto del tipo de agitación y pH en la obtención de fosfatos cálcicos por síntesis química”. Tesis de Pregrado. IPN.
58. **Raizada, P., Shandilya, P., Singh, P., & Thakur, P. (2017).** Solar light-facilitated oxytetracycline removal from the aqueous phase utilizing a H₂O₂/ZnWO₄/CaO catalytic system. *Journal of Taibah University for Science*, 11(5), 689–699. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2016.06.004>
59. **Ramesh, S., Tan, C. Y., Hamdi, M., Sopyan, I., & Teng, W. D. (2007, July 18).** *The influence of Ca/P ratio on the properties of hydroxyapatite bioceramics*. 64233A. <https://doi.org/10.1117/12.779890>
60. **Rutherford, R. S., & Van Staden, J. (1996).** Towards a rapid near-infrared technique for prediction of resistance to sugarcane borer *Eldana saccharina* walker (Lepidoptera:

Pyralidae) using stalk surface wax. *Journal of Chemical Ecology*.
<https://doi.org/10.1007/BF02033578>

61. **Skoog, D. et al. (2007)**. Principios de análisis instrumental. Sexta edición. Cengage Learning.

62. **Sabu, U., Logesh, G., Rashad, M., Joy, A., & Balasubramanian, M. (2019a)**. Microwave assisted synthesis of biomorphic hydroxyapatite. *Ceramics International*, 45(6), 6718–6722. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.12.161>

63. **Sathiyavimal, S., Vasantharaj, S., LewisOscar, F., Pugazhendhi, A., & Subashkumar, R. (2019)**. Biosynthesis and characterization of hydroxyapatite and its composite (hydroxyapatite-gelatin-chitosan-fibrin-bone ash) for bone tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 844–852. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.02.058>

64. **Shavandi, A., Bekhit, A. E.-D. A., Ali, A., & Sun, Z. (2015a)**. Synthesis of nano-hydroxyapatite (nHA) from waste mussel shells using a rapid microwave method. *Materials Chemistry and Physics*, 149–150, 607–616. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2014.11.016>

65. **Shih, W. J., Chen, Y. F., Wang, M. C., & Hon, M. H. (2004)**. Crystal growth and morphology of the nano-sized hydroxyapatite powders synthesized from $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and CaCO_3 by hydrolysis method. *Journal of Crystal Growth*. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2004.06.023>

66. **Shih, W. J., Wang, J. W., Wang, M. C., & Hon, M. H. (2006)**. A study on the phase transformation of the nanosized hydroxyapatite synthesized by hydrolysis using in situ high temperature X-ray diffraction. *Materials Science and Engineering C*. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.08.005>

67. **Sivakumar, M., Kumar, T. S. S., Shantha, K. L., & Rao, K. P. (1996)**. Development of hydroxyapatite derived from Indian coral. *Biomaterials*, 17(17), 1709–1714. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)87651-4](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)87651-4)

68. **Sunil, B. R., & Jagannatham, M. (2016)**. Producing hydroxyapatite from fish bones by heat treatment. *Materials Letters*, 185, 411–414. <https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2016.09.039>

69. **Szcześ, A., Holysz, L., & Chibowski, E. (2017)**. Synthesis of hydroxyapatite for

biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.007>

70. **Taylor, B. L., Andric, T., & Freeman, J. W. (2013)**. Recent Advances in Bone Graft Technologies. *Recent Patents on Biomedical Engineering*.
<https://doi.org/10.2174/1874764711306010006>

71. **Tighe, B. J., & Mann, A. (2016)**. The development of biomaterials for contact lens applications: Effects of wear modality on materials design. *Biomaterials and Regenerative Medicine in Ophthalmology*, 369–399. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100147-9.00015-8>

72. **Tuesta, E. et al. (s/a)**. Aplicación de la técnica de difracción de rayos x en la industria minera. Laboratorios BISA. Pp. 210-214

73. **Ungureanu, D. et al. (2015)**. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanopowders by Chemical Precipitation. *Rec. Res. Com. Aut. Sign. Proc. Nanot. Astr. Nucl. Ph*, pp.296-301.

74. **unab. (n.d.)**. Microscopia Electrónica de Barrido con detector EDS (SEM-EDS) | Departamento de Ciencias Químicas UNAB| UNAB. Retrieved August 5, 2019, from <http://quimica.unab.cl/laboratorio-de-analisis-de-solidos-las/informacion/fundamentos-teoricos/microscopia-electronica-de-barrido-con-detector-eds-sem-eds/>

75. **Universidad Andres Bello. (n.d.)**. Microscopia Electrónica de Barrido con detector EDS (SEM-EDS) | Departamento de Ciencias Químicas UNAB| UNAB. Retrieved August 3, 2019, from <http://quimica.unab.cl/laboratorio-de-analisis-de-solidos-las/informacion/fundamentos-teoricos/microscopia-electronica-de-barrido-con-detector-eds-sem-eds/>

76. **Vann, L., Layfield, J. B., & Sheppard, J. D. (2017)**. The application of near-infrared spectroscopy in beer fermentation for online monitoring of critical process parameters and their integration into a novel feedforward control strategy. *Journal of the Institute of Brewing*.
<https://doi.org/10.1002/jib.440>

77. **Vecchio, K. S., Zhang, X., Massie, J. B., Wang, M., & Kim, C. W. (2007)**. Conversion of sea urchin spines to Mg-substituted tricalcium phosphate for bone implants. *Acta Biomaterialia*, 3(5), 785–793. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2007.03.009>

78. **Wu, S.-C., Hsu, H.-C., Hsu, S.-K., Chang, Y.-C., & Ho, W.-F. (2016).** Synthesis of hydroxyapatite from eggshell powders through ball milling and heat treatment. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 4(1), 85–90. <https://doi.org/10.1016/J.JASCER.2015.12.002>
79. **Walter, J. et al., (2013).** Nanosuspensiones: Disminución del tamaño de partícula como herramienta para mejorar la biodisponibilidad de fármacos liposolubles. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 44(4), pp. 7-16
80. **Workman, G. (1999).** A Review of the Biology and Fisheries for Purple Sea Urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*, Stimpson, 1857) and Discussion of the Assessment Needs for a Proposed Fishery. Accesado el día 04/agosto/2019. Disponible en http://publications.gc.ca/collections/collection_2015/mpo-dfo/Fs70-1-1999-163-eng.pdf
81. **Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A., & Yu, S. (2015).** Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *Nature Protocols*, 10(3), 382–396. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.024>
82. **Zhang, Q., Wu, W., Qian, C., Xiao, W., Zhu, H., Guo, J., ... Cui, W. (2019).** Advanced biomaterials for repairing and reconstruction of mandibular defects. *Materials Science and Engineering: C*, 103, 109858. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.109858>