

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**Obtención y funcionalización de hidroxiapatita a partir del exoesqueleto de erizo**

**de mar morado *Strongylocentrotus purpuratus***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS PRESENTA:

**EDGAR MANCILLA SÁNCHEZ**

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. AGOSTO DE 2020.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

**Obtención y funcionalización de hidroxiapatita a partir del exoesqueleto**


**de erizo de mar morado *Strongylocentrotus purpuratus***

**TESIS**

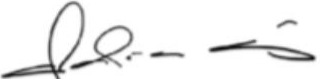
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS PRESENTA:

**EDGAR MANCILLA SÁNCHEZ**


Aprobada por:

  
Dr. Priscy Alfredo Luque Morales  
Director de tesis

  
Dra. Graciela Guerra Rivas  
Co-director de tesis

  
Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez  
Miembro del comité

  
Dra. Patricia Juárez Camacho  
Miembro del comité

  
Dr. Rubén César Villarreal Sánchez  
Miembro del comité

Ensenada Baja California, México. Agosto de 2020

*“Si tuviera la suerte de alcanzar alguno de mis ideales,  
sería en nombre de toda la humanidad”*

**Nikola Tesla**

## DEDICATORIA

A mi mamá que siempre me ha alentado a ser una mejor persona y superarme, por todo el amor, apoyo y consejo que me ha brindado, porque siempre ha sido un ejemplo de vida para mí. Tus palabras guiaron mis pasos, tu cariño suavizó mi carácter y tu amor ilumina mi vida. ¡Gracias ma!

A mi papá que me ha guiado en la vida transmitiéndome toda la sabiduría que solo él sabe brindar, por ser mi súper héroe y apoyarme en cada uno de los proyectos que he realizado, alentándome a seguir siempre mis sueños y darme la mano en todo momento, ¡te estaré eternamente agradecido pa!

A mi Nalle, tu ayuda ha sido fundamental y has estado conmigo incluso en las situaciones más difíciles, no fue fácil llegar hasta aquí, pero estuviste brindándome tu apoyo y motivación en todo momento, gracias por todas las horas de desvelo a mi lado ayudando a hacer este trabajo realidad, ¡muchas gracias amor!

A la Dra. Graciela Guerra Rivas, una de las mentoras y guías más importantes de mi vida, sin duda la mejor científica que he podido conocer, y con quién estaré por siempre agradecido por creer en mí. Sus enseñanzas las llevo en mi corazón, ¡muchísimas gracias por todo el esfuerzo y la paciencia que me tuvo profe!

## Agradecimientos

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

A la Dra. Graciela Guerra Rivas por sus invaluable enseñanzas, su paciencia, asesoría y dirección en la realización de este trabajo.

Al Dr. Priscy Alfredo Luque Morales, por el apoyo, y la guía que me brindó en la elaboración de este proyecto

A la Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez por sus consejos, asesoría y esfuerzos realizados.

A la Dra. Patricia Juárez Camacho por sus aportes, y puntos de vista tan acertados para un trabajo exitoso.

Al Dr. Rubén César Villarreal Sánchez, por las correcciones, comentarios y el tiempo dedicado a este trabajo, contribuyendo al éxito de esta investigación.

A la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño de la UABC, por el soporte institucional dado para la realización de este trabajo.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

## Resumen

En el presente trabajo se presentan dos vías de síntesis (con digestión y sin digestión ácida previa a la síntesis), así como un método de funcionalización simple, rápido y efectivo de hidroxiapatita a partir del exoesqueleto de erizo de mar morado *Strongylocentrotus purpuratus*. Lo anterior fue logrado al someter el exoesqueleto a tiempos de reacción diferentes (3, 18 y 36 horas), así como a diversos tratamientos pre, post-síntesis y a la modificación de su superficie mediante la adición de aminoácidos (L-Arg y L-Glu) para fijar proteínas con cargas opuestas (Lactoferrina y BSA) a la superficie del biomaterial.

La capacidad de adsorción de la hidroxiapatita funcionalizada fue evaluada mediante la elaboración de isothermas de adsorción de Langmuir y Freundlich, mismas que ayudaron a confirmar que la adsorción de proteínas a la superficie del biomaterial se da de una manera irregular y heterogénea.

La obtención y funcionalización de la hidroxiapatita se confirmaron mediante la caracterización de los materiales obtenidos, realizada mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía de dispersión de energía (EDS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).



---

Dr. Priscy Alfredo Luque Morales  
Vo. Bo. Director de tesis



---

Dra. Graciela Guerra Rivas  
Vo. Bo. Co-director de tesis

## Índice

I.	Introducción .....	11
II.	Antecedentes .....	18
III.	Hipótesis.....	24
IV.	Objetivo general .....	25
V.	Objetivos específicos .....	25
VI.	Metodología.....	25
VI.1	Obtención de los organismos .....	25
VI.2	Preparación de los exoesqueletos .....	26
VI.3	Obtención de HA.....	26
VI.4	Caracterización de HA .....	28
VI.5	Funcionalización de HA .....	28
VI.6	Obtención de HA-Arg y HA-Glu durante la síntesis de HA .....	28
VI.7	Funcionalización de HA comercial y funcionalización de HA derivada de erizo después de la síntesis con L-Arg y L-Glu .....	29
VI.8	Caracterización de grupos funcionales de HA-Arg y HA-Glu.....	29
VI.9	Liberación de L-Arg y L-Glu a pH=5 .....	30
VI.10	Adsorción de L-Arg y L-Glu a HA.....	30
VI.11	Funcionalización con lactoferrina.....	30
VI.12	Isoterma de Langmuir .....	31
VI.13	Isoterma de Freundlich .....	31
VI.14	Caracterización de grupos funcionales de HA-Arg-Lf y HA-Glu-Lf .....	32
VI.15	Funcionalización con albúmina .....	32
VI.16	Isoterma de Langmuir .....	32
VI.17	Isoterma de Freundlich .....	32
VI.18	Caracterización de grupos funcionales de HA-Arg-BSA y HA-Glu-BSA .....	33
VI.19	Liberación de L-Arg, L-Glu, Lf y BSA en fluido fisiológico.....	33
VI.20	Análisis estadístico .....	33
VII.	Resultados .....	34
VII.1	Caracterización de HA.....	34
VII.1.1	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	34
VII.1.2	Difracción de rayos X (DRX) .....	38
VII.1.3	Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	43
VII.1.4	Espectroscopía de dispersión de energía (EDS).....	43

VII.1.5	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	45
VII.2	Funcionalización de HA .....	47
VII.2.1	Caracterización de grupos funcionales de HA-Arg y HA-Glu .....	47
VII.2.2	Liberación de L-Arg de HA derivada de erizo y HA comercial funcionalizadas después de la síntesis a pH=5. ....	48
VII.2.3	Liberación de L-Glu de HA derivada de erizo y HA comercial a pH=5. ..	51
VII.2.4	Determinación de cantidad de L-Arg adsorbida a la HA.....	54
VII.2.5	Determinación de cantidad de L-Glu adsorbida a la HA.....	54
VII.2.6	Liberación de L-Arg y L-Glu en condiciones fisiológicas .....	55
VII.2.7	Funcionalización con lactoferrina .....	59
VII.2.8	Funcionalización con albúmina .....	67
VIII.	Discusión .....	75
IX.	Conclusiones.....	83
X.	Referencias.....	84

## Lista de tablas y figuras

Figura 1.	Clasificación de biomateriales según sus distintas características .....	12
Figura 2.	Estructura de la HA en la que se pueden observar los sitios C y P, así como los grupos OH <sup>-</sup> característicos de este biomaterial, tomado de Dutta et al., 2015 .....	16
Figura 3.	métodos comúnmente utilizados para la síntesis de HA a partir de fuentes naturales. Tomado de Mohd Pu'ad et al., 2019.....	22
Figura 4.	Exoesqueletos de erizo morado limpios.....	26
Figura 5.	Espectro FTIR de la HA que se obtuvo a partir del tratamiento 1 y espectro de HA comercial. Se observan los picos característicos de los grupos funcionales esperados de HA: PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> y OH <sup>-</sup> , así como los picos de grupos CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> no deseados. Espectro FTIR de la HA que se obtuvo a partir del tratamiento 1 y espectro de HA comercial.....	35
Figura 6.	Espectro FTIR de la HA obtenida del tratamiento 2 y de HA comercial. ....	35
Figura 7.	Espectro FTIR de la HA obtenida del tratamiento 3 y de HA comercial. ....	36
Figura 8.	Espectros FTIR de la HA obtenida del tratamiento 4. ....	37
Figura 9.	Espectro de DRX de HA obtenida con el tratamiento 1, en el que se muestran los picos característicos de la brushita con sus respectivos planos cristalinos. ....	38
Figura 10.	Espectro de DRX de la HA obtenida con el tratamiento 2.....	39
Figura 11.	Espectro de DRX de la HA obtenida con el tratamiento 3.....	40
Figura 12.	Espectros de DRX de HA obtenida con el tratamiento 4 y CaCO <sub>3</sub> comercial .....	42
Figura 13.	Micrografías SEM tomadas a x2000 para a) 3, b) 18, c) 36 horas y d) síntesis con digestión previa de la materia prima con HNO <sub>3</sub> respectivamente. ....	43
Figura 14.	Espectros de energía dispersiva de HA obtenida a 18 horas de tiempo de reacción a) y con digestión previa con HNO <sub>3</sub> b). ....	44

Figura 15. Micrografías TEM de la HA obtenida para el tratamiento 2.....	46
Figura 16. Micrografías TEM de la HA obtenida para el tratamiento 4.....	46
Figura 17. Espectro FTIR de HA funcionalizada con L-Arg a). Espectro FTIR de HA funcionalizada con L-Glu b).Ambas muestras presentan sus grupos funcionales característicos adicionales a los grupos NH <sub>2</sub> y C=O, característicos de los aminoácidos. ....	47
Figura 18. Espectro de DRX de la HA funcionalizada con L-Arg a). Espectro de DRX de la HA funcionalizada con L-Glu b).Se muestran los picos característicos que se identificaron, con sus respectivos planos cristalinos. ....	48
Figura 19. Liberación de L-Arg a lo largo de 11 días a pH=5.....	49
Figura 20. Liberación de L-Arg en pH=5.Diferencias entre las medias de cada HA funcionalizada durante la síntesis (Erizo morado y CaCO <sub>3</sub> ) y la HA funcionalizada después de la síntesis(Post prec.). $\alpha=95\%$ . ....	50
Figura 21. Liberación de L-Glutamato a lo largo de 11 días a pH=5.....	52
Figura 22. Liberación de L-Glu en pH=5.Diferencias entre las medias de cada HA funcionalizada durante la síntesis (Erizo morado y CaCO <sub>3</sub> ) y la HA funcionalizada post-precipitación (Post prec.). $\alpha=95\%$ . ....	53
Figura 23. Curva de calibración para la determinación de L-Arg.. ....	54
Figura 24. Curva de calibración para la determinación de L-Glutamato.....	55
Figura 25. Liberación de L-Arg a lo largo de 11 días en condiciones fisiológicas, comparación entre <b>a)</b> HA sintetizada a partir de exoesqueleto de erizo y <b>b)</b> HA sintetizada a partir de CaCO <sub>3</sub> comercial .....	56
Figura 26. Liberación de L-Arg en condiciones fisiológicas y liberación de L-Arg en pH=5. Diferencias entre las medias de cada HA funcionalizada durante la síntesis (Erizo morado y CaCO <sub>3</sub> , $\alpha=95\%$ ).....	57
Figura 27. Liberación de L-Glutamato a lo largo de 11 días en condiciones fisiológicas, comparación entre <b>a)</b> HA sintetizada a partir de exoesqueleto de erizo y <b>b)</b> HA sintetizada a partir de CaCO <sub>3</sub> comercial .....	58
Figura 28. Liberación de L-Glu en condiciones fisiológicas y liberación de L-Glu en pH=5.Diferencias entre las medias de cada HA funcionalizada durante la síntesis (Erizo morado y CaCO <sub>3</sub> , $\alpha=95\%$ ).....	59
Figura 29. Isotherma de adsorción de Langmuir de Lf a HA-Arg. La línea azul representa los datos obtenidos de la adsorción de Lf, mientras que la línea naranja es el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Langmuir. ....	60
Figura 30. Isotherma de adsorción de Langmuir de Lf a HA-Glu. La línea azul representa los datos obtenidos de la adsorción de Lf, mientras que la línea naranja es el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Freundlich.....	62
Figura 31. Isotherma de adsorción de Freundlich de Lf a HA-Arg. La línea naranja representa los datos obtenidos de la adsorción de Lf, mientras que la línea azul es el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Freundlich.. ....	63
Figura 32. Isotherma de adsorción de Freundlich de Lf a HA-Arg. La línea naranja representa los datos obtenidos de la adsorción de Lf, mientras que la línea azul es el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Freundlich.. ....	65
Figura 33. Espectro FTIR de HA-Arg funcionalizada con Lf, en el que se aprecian los picos característicos de los grupos funcionales de la HA así como los picos característicos de las amidas I, II y III. ....	66

Figura 34. Espectro FTIR de HA-Glu funcionalizada con Lf, en el que se aprecian los picos característicos de los grupos funcionales de la HA así como los picos característicos de las amidas I, II y III. ....	67
Figura 35. Isoterma de adsorción de Langmuir de BSA a HA-Arg. La línea azul representa los datos obtenidos de la adsorción de BSA, mientras que la línea naranja es el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Langmuir.....	68
Figura 36. Isoterma de adsorción de Langmuir de BSA a HA-Glu. La línea azul representa los datos obtenidos de la adsorción de BSA, mientras que la línea naranja es el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Langmuir.....	69
Figura 37. Isoterma de adsorción de Freundlich de BSA a HA-Arg. La línea naranja representa los datos obtenidos de la adsorción de BSA, mientras que la línea azul es el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Freundlich. ....	70
Figura 38. Isoterma de adsorción de Freundlich de BSA a HA-Glu.. ....	71
Figura 39. Espectro FTIR de HA-Arg funcionalizada con BSA, en el que se aprecian los picos característicos de los grupos funcionales de la HA así como los picos característicos de las amidas I, II y III. ....	72
Figura 40. Espectro FTIR de HA-Glu funcionalizada con BSA, en el que se aprecian los picos característicos de los grupos funcionales de la HA así como los picos característicos de las amidas I, II y III. ....	73
Figura 41. Liberación de BSA (a y Lf (b de HA-Arg, en condiciones fisiológicas. ....	74
Figura 42. Liberación de BSA (a y Lf (b de HA-Glu, en condiciones fisiológicas. ....	75
Figura 43. Vía de reacción propuesta para la síntesis de HA a partir de CaCO <sub>3</sub> en condiciones ácidas. ....	77

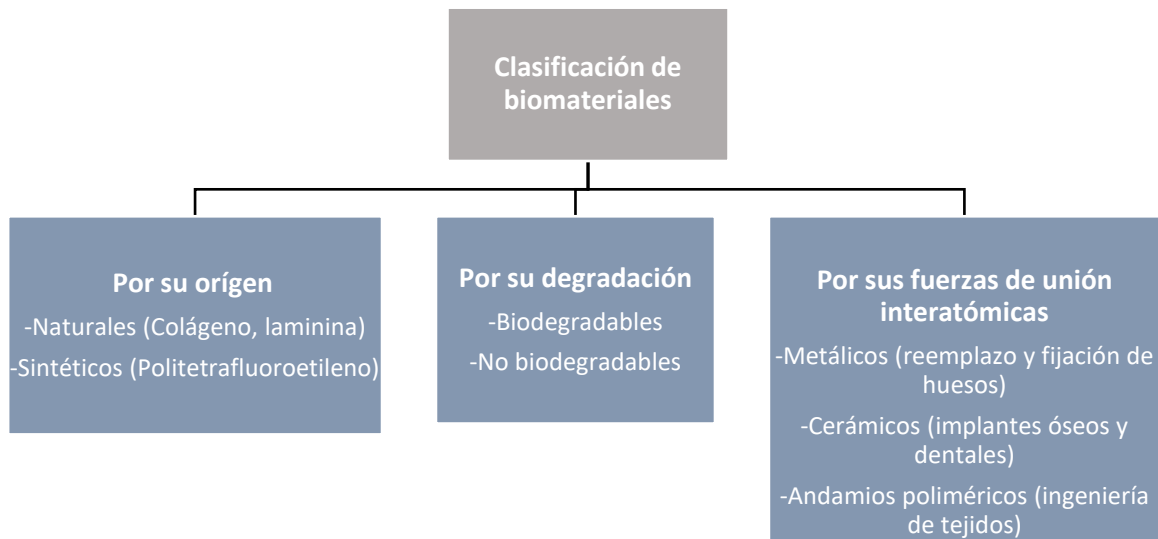
Tabla 1. Efecto de diferentes métodos de síntesis de HA a partir de algunos desechos marinos.. ....	21
Tabla 2. Tratamientos y sus diferentes variables .....	27
Tabla 3. Prueba de Tukey de la liberación de L-Arg ( $\alpha=95\%$ ) en pH=5.0. ....	50
Tabla 4. Prueba de Tukey de la liberación de L-Glutamato ( $\alpha=95\%$ ) en pH=5.0. ....	53
Tabla 5. Prueba de Tukey de la liberación de L- Arg ( $\alpha=95\%$ ) en condiciones fisiológicas (pH7.4, 37°C) y de liberación de L- Arg en pH=5.0. ....	56
Tabla 6. Prueba de Tukey de la liberación de L-Glutamato en condiciones fisiológicas (pH7.4, 37°C) y liberación de L- Arg en pH=5.0 ( $\alpha=95\%$ ). ....	58
Tabla 7. Parámetros obtenidos para el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Langmuir. ....	60
Tabla 8. Parámetros obtenidos para el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Langmuir. ....	61
Tabla 9. Parámetros obtenidos para el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Freundlich. ....	63
Tabla 10. Parámetros obtenidos para el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Freundlich. ....	64

## I. Introducción

En los últimos años, la investigación biomédica ha tenido una inclinación mucho mayor hacia la ciencia de los materiales, buscando la aplicación de éstos en el uso de la salud. En los años 50, el principal objetivo era utilizar materiales que no tuvieran reacción alguna con los tejidos vivos de un organismo. En un inicio, la falta de toxicidad de un material era suficiente para considerarlo como un material biocompatible; sin embargo, a partir de los años 80 este enfoque cambió radicalmente y el objetivo principal se convirtió en desarrollar biomateriales que puedan reaccionar con el organismo para favorecer la recuperación tisular (Ong, Appleford, & Mani, 2013; Vallet-Regi & Ruiz-Hernandez, 2011).

Los biomateriales son en esencia materiales que son utilizados y han sido adaptados para alguna aplicación médica; por ejemplo, pueden ser utilizados en la construcción de una válvula cardíaca, para transportar y liberar fármacos, o bien para recubrir implantes óseos con materiales como los fosfatos de calcio. En general se puede definir a un biomaterial como cualquier material, natural o sintético que conforma de manera parcial o total, parte de una estructura viva o de un dispositivo biomédico, el cual aumenta o reemplaza una función natural (Patel & Gohil, 2012).

La clasificación de los biomateriales se basa en las diferentes características de los mismos. Estos pueden ser clasificados de acuerdo a su origen, a su tipo de degradación, o bien basándonos en sus fuerzas de unión interatómicas (Figura 1) (Birla, 2014) .



*Figura 1. Clasificación de biomateriales según sus distintas características (Birla, 2014)*

Los biomateriales se han originado a partir de investigaciones en diferentes áreas en las que se identifican las capacidades de cierto material para interactuar con diversos tejidos y tipos celulares (Hench, 1991). Dentro de estos materiales, el uso de biocerámicas y biovidrios para la reparación y reconstrucción esquelética ha incrementado, debido a que se ha observado que ayudan a mejorar la calidad de vida de las personas afectadas por lesiones en el sistema óseo (Oh, Oh, Appleford, & Ong, 2006). Estos materiales pueden ser producidos tanto en forma densa y porosa, como en polvos, granulados o recubrimientos y por lo general muestran una gran biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad y osteoinductividad (Boutinguiza et al., 2012; Thamaraiselvi & Rajeswari, 2004).

Actualmente las biocerámicas pueden ser sintetizadas a partir de diversas fuentes; sin embargo, hasta ahora todos los intentos para sintetizar materiales de reemplazo óseo

han tenido únicamente un éxito relativo ya sea por la poca tolerancia fisiológica, biocompatibilidad y estabilidad a largo plazo, lo cual demuestra tanto la superioridad como la complejidad de las estructuras naturales (S. Dorozhkin, 2013).

Una de las biocerámicas más utilizadas en la regeneración ósea y dental es la hidroxiapatita (HA); este material es similar a la composición inorgánica del hueso, lo que propicia su biocompatibilidad, permitiendo la regeneración del hueso y la adhesión celular (Dutta, Passi, Singh, & Bhuibhar, 2015; Pepla, Besharat, Palaia, Tenore, & Migliau, 2014; J. Venkatesan & Kim, 2014). Otra característica importante es que, a diferencia de otros fosfatos de calcio, no se degrada bajo condiciones fisiológicas, es termodinámicamente estable en un pH fisiológico y tiene un papel importante en la formación ósea, creando fuertes enlaces químicos con el tejido óseo que le rodea (Akram, Ahmed, Shakir, Ibrahim, & Hussain, 2013). Por lo anterior, este material ha sido el más utilizado como sustituto de hueso por alrededor de 50 años (Monroe, Votava, Bass, & McMullen, 1971), periodo durante el cual se ha logrado establecer que la relación Ca/P ideal para este biomaterial es de 1.67 (Park, 2009), parámetro relacionado directamente con la solubilidad del biomaterial, entre más baja sea la relación Ca/P, más soluble resulta el biomaterial, por lo que a valores alrededor de 1.70 el contenido de carbonato disminuye, lo que al final se traduce en un tejido esquelético mucho más duro y mejor mineralizado (S. V. Dorozhkin & Epple, 2002).

Si bien es importante establecer la composición química, también es necesario conocer la estructura molecular de un biomaterial, ya que de esta dependerán las propiedades mecánicas y en consecuencia su posible implementación como biomaterial

(Ong et al., 2013). En el caso de la HA, estas propiedades dependen del tamaño de grano, su distribución, porosidad y otros defectos microestructurales, por lo que la caracterización de la HA tiene el fin de establecer si esta biocerámica tiene características similares al hueso. En cuanto al tamaño y estructura de poro, el cual debe estar en un intervalo de 100 a 500  $\mu\text{m}$ . El rango mínimo de 100-150  $\mu\text{m}$  es requerido para permitir el crecimiento interno del hueso así como para otorgar un adecuado suministro de sangre, otros trabajos reportan que tamaños de 200 hasta 500  $\mu\text{m}$  son ideales para favorecer la colonización de osteoblastos dentro de los poros, el crecimiento fibrovascular y la deposición de hueso nuevo (Sopyan, Mel, Ramesh, & Khalid, 2007). Es vital que los poros se encuentren interconectados para facilitar la interconexión y vascularización celular.

Uno de los principales enfoques de la ingeniería de tejidos es la regeneración ósea, para lo cual, es necesario considerar la producción de materiales biocompatibles con características muy similares al hueso, que permitan la migración celular, vascularización y difusión de nutrientes (Sequeda, Díaz, Gutiérrez, Perdomo, & Gómez, 2012).

Lo anterior evidencia la importancia de la búsqueda de mejores y más eficientes métodos de síntesis de este biomaterial, ya que las propiedades físicas, químicas y biológicas de la HA están directamente relacionadas con su efectividad en el tipo de aplicación que se quiere utilizar. Hasta hoy diversas estrategias y métodos de síntesis se han desarrollado para controlar la composición química y estructura de la hidroxiapatita, sin embargo los mecanismos de control detrás de cada proceso de síntesis varían, por lo que es de gran importancia conocer e investigar los hasta ahora desconocidos

mecanismos reales para controlar la composición química y estructura, mismos que son críticos para el diseño de productos de HA para diferentes aplicaciones biomédicas.

De igual manera, la búsqueda de fuentes naturales como materia prima en la producción de HA es de suma importancia, pues algunos iones como  $Mg^{2+}$  han sido identificados como favorables en la proliferación celular del tejido óseo al ser integrados a la HA (Landi et al., 2006) , dichos iones están contenidos en la composición de algunos desechos como lo son los exoesqueletos del erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* (LaVigne et al., 2013), y pueden otorgar elementos favorables para la osteogénesis a la HA.

Otro de los aspectos importantes en la obtención de biomateriales, es la evaluación de su biocompatibilidad; es decir, el conocimiento y la certeza de que ninguno de sus componentes ocasionará efectos adversos en el organismo al ser utilizado en la elaboración de biodispositivos. La forma más sencilla de evaluar esta propiedad es a través de ensayos *in vitro*, en los que se prueba la toxicidad del material hacia células. La evaluación citotóxica es uno de los estudios más utilizados para determinar la biocompatibilidad de un material y presenta una correspondencia de un 97 % con los ensayos de implantación. Estos ensayos son simples, rápidos y económicos además de que proporcionan información valiosa de los materiales que deben ser descartados o aquellos que deben ser sometidos a análisis más rigurosos. Actualmente, hay diversos métodos para determinar la citotoxicidad de los biomateriales y equipos médicos implantables, estos consisten en observar la inhibición del crecimiento celular o registrar el daño o muerte celular (Hernández & Cañas, 2006).

Además de las características ya mencionadas, la HA posee la capacidad de ser funcionalizada mejorando así sus capacidades regenerativas mediante la adición de moléculas que, ancladas a su superficie, pueden mejorar sus capacidades de biomineralización del tejido óseo (Orlovskii, Komlev, & Barinov, 2002).

Lo anterior es posible debido a que los cristales de HA poseen 2 sitios de unión diferentes en su superficie (Sitios C y P) (Figura 2). Al suspender la HA en un medio acuoso, los sitios C quedan expuestos debido a la liberación de iones  $\text{OH}^-$  de la superficie del cristal, lo que provoca que los cristales queden con iones  $\text{Ca}^{2+}$  expuestos en su superficie, mismos que tienen la capacidad de interactuar con grupos o proteínas con cadenas laterales disociables y con carga negativa a pH fisiológico. Por otro lado los sitios P, contienen iones cargados negativamente ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) que interactúan a su vez con grupos o proteínas con cadenas laterales con carga positiva (Haider, Haider, Han, & Kang, 2017).

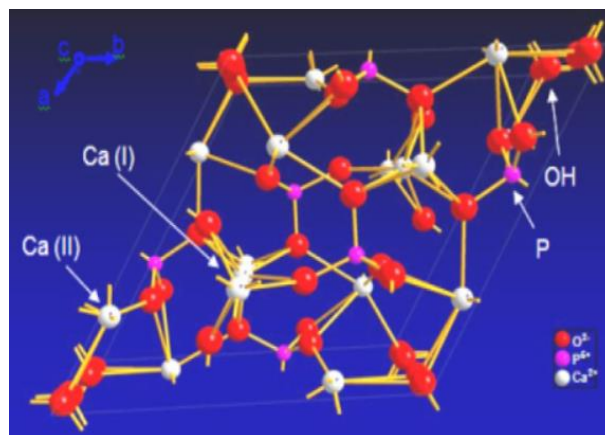


Figura 2. Estructura de la HA en la que se pueden observar los sitios C y P, así como los grupos  $\text{OH}^-$  característicos de este biomaterial, tomado de Dutta et al., 2015

Cabe destacar, que los tipos de interacción entre la HA y las moléculas que se quieren inmovilizar en su superficie no dependen únicamente de la naturaleza química de la HA, también influye en gran medida la estrategia que se utilice para funcionalizar el biomaterial. De manera general, los mecanismos de funcionalización se pueden clasificar en 3 grupos (W. H. Lee, Loo, & Rohanzadeh, 2014).

- Inmovilización química: este tipo de funcionalización se basa en la modificación de la carga, energía de superficie y la composición del biomaterial, y se logra mediante la inmovilización covalente de grupos funcionales orgánicos, bombardeo de iones, y/o tratamiento con ácidos o bases. La ventaja que representa este tipo de funcionalización es que al depender de enlaces covalentes, las proteínas o moléculas a inmovilizar quedan fuertemente unidas a la superficie de la HA a través de ligandos, ya que los grupos funcionales de las proteínas se unen a los ligandos inmovilizados en la superficie del biomaterial (W. H. Lee, Loo, Chrzanowski, & Rohanzadeh, 2015; Treccani, Yvonne Klein, Meder, Pardun, & Rezwan, 2013).
- Inmovilización por bioafinidad: este tipo de funcionalización se da cuando una biomolécula es inmovilizada por interacciones de afinidad con otra biomolécula, no es una funcionalización muy utilizada, debido a que la gran desventaja que presenta es que las proteínas o enzimas con las que se pretende funcionalizar pueden quedar inactivas debido al bloqueo de sus sitios activos por las

interacciones de afinidad con otras biomoléculas(W. H. Lee et al., 2014; Nelson, Balasundaram, & Webster, 2006; C. Wang, Liu, Fan, & Li, 2017).

- Inmovilización física: En este tipo de funcionalización, el tipo de interacción que se aprovecha en estos casos son interacciones débiles no covalentes, tales como fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno o unión mediante la interacción de las cargas electrostáticas de ambas moléculas. La ventaja que representa este tipo de inmovilización es que no existe modificación estructural del biomaterial ni de la proteína o molécula a inmovilizar; sin embargo las capacidades de adsorción son muy bajas debido a la debilidad de los enlaces y la poca especificidad que posee este método (W.-H. Lee, Loo, Zavgorodniy, Ghadiri, & Rohanizadeh, 2013; W. H. Lee et al., 2014; W. H. Lee, Loo, Van, Zavgorodniy, & Rohanizadeh, 2012).

## II. Antecedentes

La hidroxiapatita (HA) fue propuesta como biocerámica para implantes óseos y dentales por primera vez en 1971, este biomaterial se obtuvo mediante sinterización de hidroxiapatita sintética a una temperatura de 1300 °C durante 15 h, y su relación Ca/P fue de 1.54; el equipo a cargo de este estudio observó que la porosidad de la cerámica incrementó al mezclar celulosa coloidal en la síntesis, por lo que sugieren por primera vez que ajustar la porosidad del biomaterial puede ser importante para promover el crecimiento y fijación de células óseas (Monroe et al., 1971). En 1999 se desarrolló un nuevo procedimiento para sintetizar HA a partir de cáscaras de huevo, el cual consistió en someter las muestras a un tratamiento térmico a 900°C por 2 horas, seguido de un

tratamiento con solución de fosfato a una temperatura de 1050 °C durante 3 horas, el producto final fue caracterizado mediante difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido, obteniendo un biomaterial con una morfología tipo fibra y aunque no fue medido, se observó un tamaño de poro uniforme (Rivera et al., 1999).

Algunas de las características importantes para obtener un biomaterial con condiciones similares a las estructuras óseas, como el tipo de morfología o el tamaño de poro de las biocerámicas sintetizadas a partir de algunas fuentes naturales como la cáscara de huevo, son altamente influenciadas por la relación ácido/óxido de calcio que se da durante la síntesis, por lo que es importante ajustar estas variables constantemente dependiendo de la naturaleza de la materia prima (Balázs, Wéber, Kövér, Horváth, & Németh, 2007).

Otras fuentes naturales como algunos desechos de la industria de la pesca se han utilizado también como materia prima para la producción de hidroxiapatita, ejemplo de esto es la síntesis a partir de hueso de peces brasileños *Pseudoplatystoma corruscans*, *Paulicea lutkeni* y *Pseudoplatystoma fasciatum*, en donde la HA se obtuvo mediante calcinación de la materia prima a 900°C durante cinco horas, obteniendo una proporción Ca/P cercana a 1.67 (Coelho et al., 2006). La matriz ósea interna del jibión de *Sepia officinalis* también se ha utilizado como fuente de HA altamente porosa, con estructuras similares a placas y barras y un diámetro promedio de 200 a 300 nm mediante tratamiento hidrotermal a 160 y 180 °C. En este caso particular, los autores proponen que al haber logrado mantener la red porosa original del jibión, es un candidato interesante para aplicaciones en ingeniería de tejidos al facilitar las interconexiones celulares (Ivankovic, Tkalcec, Orlic, Ferrer, & Schauerl, 2010).

Conforme han avanzado las investigaciones, otros huesos de peces importantes para la industria alimentaria también han sido aprovechados para producir HA mediante métodos diferentes que han ido mejorando las características del biomaterial, dentro de estos encontramos los huesos de atún *Thunnus obesus*, con los cuales mediante hidrólisis alcalina se logró obtener HA con un tamaño menor de partícula (0.3  $\mu\text{m}$ ) y una estructura de nanobastones, por lo que es apta para más aplicaciones que la obtenida mediante calcinación (Jayachandran Venkatesan, Qian, Ryu, Thomas, & Kim, 2011), el hueso de pez espada *Xiphias gladius* se utilizó para obtener HA mediante calcinación a 600°C, pero además se identificó que el contenido de elementos traza de la materia prima como Mg y Sr, pueden actuar como agentes promotores de la recuperación de una lesión, de lo cual, la HA sintética carece (Boutinguiza et al., 2012).

De la misma forma en que los desechos de peces han sido utilizados, se han explorado otras fuentes como los desechos de moluscos, tal es caso de la concha del caracol de mar *Cerithium vulgatum*, de la cual se obtuvieron nano polvos de HA mediante un nuevo método simple y económico que consiste en la calcinación de la materia prima en aire durante 4 horas a temperaturas de 400°C y 800°C, (Gunduz, Sahin, Agathopoulos, Ben-Nissan, & Oktar, 2014), las conchas de abulón *Haliothis sp* también se utilizaron para obtener HA, misma que fue probada en ensayos de citotoxicidad en células derivadas de osteosarcoma, donde se observó que no tenía efectos citotóxicos (J. S. Kim & Kim, 2015).

En algunos trabajos previos se ha sintetizado HA a partir de desechos de algunos bivalvos mediante distintos métodos, mismos que han tenido efectos diferentes en la forma y tamaño de partícula del biomaterial (Tabla 1).

*Tabla 1. Efecto de diferentes métodos de síntesis de HA a partir de algunos desechos marinos. Adaptado de Mohd Pu'ad, Koshy, Abdullah, Idris, & Lee, 2019.*

<b>Fuente</b>	<b>Método de síntesis</b>	<b>Tamaño de partícula</b>	<b>Forma</b>
Concha de cárdidos	Calcinación + precipitación Sol-gel	4.03 -10.04 $\mu\text{m}$	Esférica
	Calcinación + hidrotermal		En forma de aguja
Concha de almeja	Calcinación + síntesis mecanoquímica	53 - 67 nm	Aglomerado poligonal
Concha de caracol	Calcinación + precipitación química	101 nm	Forma de varilla
Concha de mejillón	Calcinación + irradiación con microondas	30 -70 nm	Forma de varilla

Los materiales de desecho de origen natural, son fuentes importantes para la extracción de biomateriales como la hidroxiapatita, y su transformación requiere métodos específicos, el efecto de estos procesos de síntesis tienen un efecto directo en las propiedades esenciales de la HA, tales como la relación Ca/P, tamaño de partícula, fases cristalinas y morfología, por lo anterior conveniente utilizar métodos de síntesis que han sido establecidos como los ideales para obtener HA con las características antes mencionadas (Akram et al., 2013; Mohd Pu'ad et al., 2019), los métodos comúnmente utilizados según el origen de la materia prima se pueden observar en la Figura 3 :

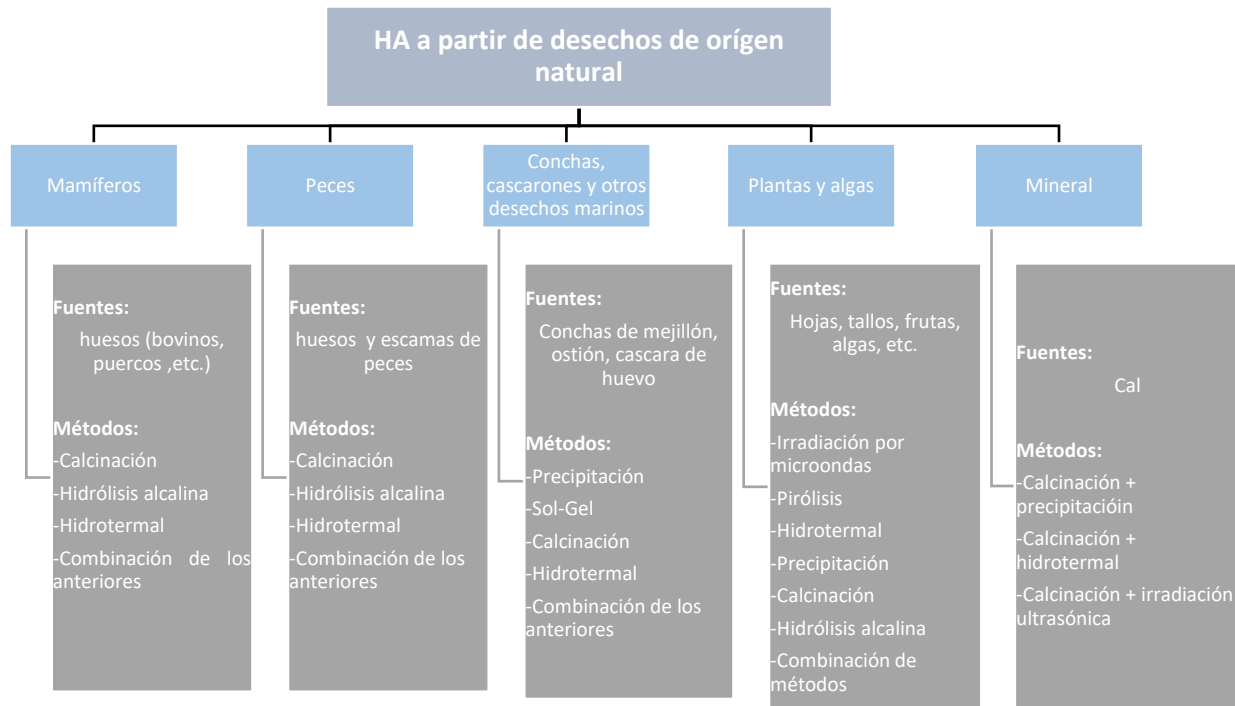


Figura 3. métodos comúnmente utilizados para la síntesis de HA a partir de fuentes naturales. Tomado de Mohd Pu'ad et al., 2019

La funcionalización de la HA se ha vuelto de gran importancia y es considerada como una herramienta fundamental para el desarrollo y el diseño de diversos dispositivos y aplicaciones biomédicas (Treccani et al., 2013). Dentro de los diversos elementos utilizados para otorgar alguna funcionalización a la HA, podemos encontrar a la BMP-2 (Bone Morphogenetic protein 2), una proteína osteogénica que además está involucrada en la inducción de la diferenciación de los osteoblastos. Al funcionalizar HA con esta proteína y probarla en osteoblastos de calvaria de ratón, se obtuvo un aumento en la formación de tejido óseo (Zurlinden, Laub, & Jennissen, 2005). De manera similar pero utilizando los iones  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  para dopar la HA, se observó una mayor adhesión y

proliferación celular en células mesenquimales y células similares a osteoblastos humanos (MG-63) (Landi et al., 2006).

Otra aproximación interesante para la funcionalización de biomateriales es integrar péptidos señal que participen en los procesos de adhesión a la matriz extracelular, tales como los péptidos KSRR (Lys-Ser-Arg-Arg) y RGD (Arg-Gly-Asp). Aunque la funcionalización ha sido exitosa, en algunos casos no se ha encontrado diferencia significativa entre la HA funcionalizada y la no funcionalizada, e incluso se ha inhibido la osteogénesis (Nelson et al., 2006) (Hennessy et al., 2008)., pero en otros se ha observado una mayor adhesión y proliferación celular (Qu, Yan, Li, Zhuang, & Huang, 2010). Péptidos derivados de la proteína OGP (Osteogenic growth peptide) junto con BMP-7 fueron probados en células madre mesenquimales, en las que hubo una inducción de diferenciación a osteoblastos (Polini et al., 2014).

Además de moléculas de alto peso molecular, moléculas como aminoácidos también han sido utilizados para funcionalizar HA, en este caso en particular se probó su efecto en la osteogénesis utilizando osteoblastos humanos de fémur, observando un aumento de proliferación celular y un incremento en la actividad de fosfatasa alcalina en la HA funcionalizada con Glu y Arg (W. H. Lee et al., 2015). También se funcionalizó HA con aminoácidos (Ala, Gly, Leu, Lys y Val), y lisozima y a pesar de no haber sido probada en cultivo celular, se obtuvo una reducción en el tamaño de cristal, un aumento en el tamaño de poro y mayor adsorción de lisozima en comparación con HA sin modificar (W. H. Lee, Loo, Zavgorodniy, & Rohanizadeh, 2013).

Hoy en día la HA sigue siendo utilizada como uno de los biomateriales predilectos para mejorar la calidad de vida de personas que sufren lesiones importantes

en el sistema esquelético, ya sea en injertos, o bien como un recubrimiento en ciertos implantes metálicos para ayudar al cuerpo en la formación de nuevo tejido óseo. Sin embargo, hasta el día de hoy se han logrado avances considerables en el entendimiento de las vías en las cuales las células y tejidos responden a este biomaterial (Mucalo, 2015; Vagaská, Bacáková, Filová, & Balík, 2010).

En las aplicaciones biomédicas, la principal fortaleza de la HA es su alta biocompatibilidad y osteoconductividad; sin embargo, su falta de osteoinductividad y bioactividad son defectos que se busca eliminar, para así lograr inducir la diferenciación osteogénica de células madre, osteoblastos, y además estimular la formación de tejido óseo nuevo, lo cual es esencial para la regeneración de defectos en huesos largos, la regeneración ósea senil y la ingeniería de tejidos óseos (Mucalo, 2015).

Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se obtuvo HA a partir del exoesqueleto del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*, desecho producto de la industria pesquera, con una relación Ca/P = 1.67, una estructura hexagonal característica de la HA, adicionalmente, el biomaterial que se obtuvo se funcionalizó para evaluar la capacidad de integrar biomoléculas promotoras de la regeneración ósea en la superficie del biomaterial.

### III. Hipótesis

La hidroxiapatita obtenida a partir del exoesqueleto de *Strongylocentrotus purpuratus*, es un biomaterial con propiedades necesarias para ser utilizado en la regeneración del tejido óseo, capaz de ser funcionalizado con un ligando y una proteína osteoinductora.

#### IV. Objetivo general

Obtener hidroxiapatita a partir del exoesqueleto de *Strongylocentrotus purpuratus* y conferirle propiedades bioactivas y osteoinductoras mediante la funcionalización del biomaterial con un ligando y una proteína osteoinductora.

#### V. Objetivos específicos

- Estandarizar el método de obtención de HA, modificando los tiempos de reacción, así como el pretratamiento de la materia prima.
- Caracterizar el producto mediante difracción de rayos X y espectroscopía infrarroja FTIR.
- Funcionalizar la hidroxiapatita obtenida con L-Arginina y L-Glutamato como ligandos y proteínas (Lactoferrina y BSA).
- Evaluar los mecanismos de adsorción y desorción de las biomoléculas al biomaterial.

#### VI. Metodología

En el presente trabajo se presenta un método para obtener una hidroxiapatita sintetizada a partir del exoesqueleto de erizo de mar *Strogylocentrotus purpuratus* y su funcionalización con aminoácidos y proteínas para evaluar las propiedades de adsorción y desorción en medio fisiológico.

##### VI.1 Obtención de los organismos

Se colectaron erizos de mar (*Strogylocentrotus purpuratus*) en la zona intermareal de las costas del ejido Eréndira, Baja California (31°16'36.8"N 116°22'34.8"W). Los organismos se transportaron al laboratorio de Ingeniería Molecular y Cultivo de Tejidos de

la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño en donde se limpiaron y se removieron las vísceras (Figura 4)



*Figura 4. Exoesqueletos de erizo morado limpios.*

## VI.2 Preparación de los exoesqueletos

Tanto las espículas como los exoesqueletos fueron secados y se les realizó un tratamiento térmico para eliminar la materia orgánica, mediante un lavado en agua caliente (80 °C) por un período de 90 minutos, para después secarlos en horno a 100°C durante 20 minutos.

Los exoesqueletos y espículas fueron fraccionados con ayuda de un molino y una espátula de acero inoxidable, con lo cual se obtuvieron las fracciones: raspado (raspando la parte interior de los exoesqueletos utilizando la espátula), molido (moliendo el exoesqueleto completo con ayuda del molino) y completo (moliendo el exoesqueleto completo con todo y espículas).

Las fracciones fueron sometidas a un tratamiento térmico a 800°C durante 10 minutos.

## VI.3 Obtención de HA

Con la finalidad de evaluar diferentes tiempos de reacción y tratamiento de la materia prima, cada una de las fracciones (500 mg) se suspendió, en 10 mL de H<sub>2</sub>O desionizada y se trabajaron con cuatro tratamientos diferentes (Tabla 2).

*Tabla 2. Tratamientos y sus diferentes variables*

Número de tratamiento	Tiempo de reacción	Digestión con HNO <sub>3</sub>
1	3 horas	No
2	18 horas	No
3	36 horas	No
4	3 horas	Si

El primer tratamiento consistió en colocar la fracción a 35°C durante 3 h con agitación constante y 0.345 µl de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 80% (volumen calculado para obtener HA con una relación Ca/P=1.67), mismo que fue añadido gota a gota para permitir que reaccionara por completo. En el segundo tratamiento la solución se hizo reaccionar durante 18 h., a 35°C, en agitación constante con 0.345 µl H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> añadido gota a gota. Para el tercer tratamiento la solución se hizo reaccionar durante 36 h, a 35°C, en agitación constante con 0.345 µl H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 80% añadido gota a gota. Para el cuarto tratamiento la suspensión fue sometida a una digestión con HNO<sub>3</sub> durante 6 h, posteriormente, la solución resultante fue filtrada y se descartó el precipitado, posteriormente el sobrenadante se hizo reaccionar durante 3 h, a 35°C, en agitación constante con 0.345 µl H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 80% añadido gota a gota (Tabla 2). El material resultante de todos los tratamientos fue filtrado, lavado hasta obtener un pH neutro y secado durante 18 h en termoplato a 60°C, una vez seco, el material fue recuperado y macerado

en un mortero de ágata hasta obtener un polvo homogéneo, el cual fue sometido a un tratamiento térmico a 600°C. Teniendo en cuenta la naturaleza de la materia prima, la cual está compuesta principalmente de CaCO<sub>3</sub>, se utilizó CaCO<sub>3</sub> comercial (Sigma-Aldrich) como grupo control en los 4 tratamientos.

#### VI.4 Caracterización de HA

Los grupos funcionales presentes en la HA que se obtuvo, se identificaron mediante espectroscopía IR, utilizando un equipo de espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR) (Perkin Elmer Spectrum Two), en un rango de 400-4000 cm<sup>-1</sup>. La estructura cristalina del material se determinó mediante difracción de rayos X (DRX), la morfología, superficie y sus dimensiones mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM), la composición elemental se obtuvo mediante espectroscopía de energía dispersiva (EDS).

#### VI.5 Funcionalización de HA

Con la finalidad de evaluar la capacidad de adsorción del biomaterial utilizando aminoácidos como ligando entre la superficie de la HA y las proteínas a adsorber, se seleccionaron 2 aminoácidos, uno con carga positiva y otro con carga negativa a pH fisiológico, L-Arginina (L-Arg) y L-Glutamato (L-Glu) respectivamente. De igual manera se seleccionaron 2 proteínas modelo con cargas positiva y negativa a pH fisiológico (Lactoferrina y BSA respectivamente).

#### VI.6 Obtención de HA-Arg y HA-Glu durante la síntesis de HA

La materia prima (exoesqueleto completo molido y CaCO<sub>3</sub> comercial como control) se sometió a una digestión con HNO<sub>3</sub> durante 6 h para obtener la solución precursora de Ca<sup>2+</sup>. La solución resultante se filtró y se descartó el precipitado, posteriormente, se

adicionaron 0.345  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 80% al sobrenadante y se aforó a 50 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada (solución precursora de  $\text{PO}_4^{3-}$ ) y se añadieron de manera simultánea a una solución al 0.2 M del respectivo aminoácido con el que se funcionalizó L-Arg (Sigma-Aldrich) y L-Glu (Sigma-Aldrich) en 1.3 M de  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  con  $\text{pH}= 10$ . Con la finalidad de obtener una solución homogénea, la suspensión resultante se dejó envejecer a  $80^\circ\text{C}$  con agitación constante durante 5 horas. Para finalizar, se recuperó el precipitado mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos, se suspendió en  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada y se lavó 5 veces con etanol absoluto dejando secar el biomaterial a  $37^\circ\text{C}$  durante toda la noche.

#### VI.7 Funcionalización de HA comercial y funcionalización de HA derivada de erizo después de la síntesis con L-Arg y L-Glu

La HA comercial (Sigma-Aldrich) y HA derivada de erizo (post precipitación) se funcionalizaron añadiendo 500 mg de ésta misma en 1.3 M de  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  conteniendo 0.2 M de L-Arg (Sigma-Aldrich) o 0.2 M de L-Glu (Sigma-Aldrich). El  $\text{pH}$  se mantuvo a 10. La suspensión resultante se dejó envejecer a  $80^\circ\text{C}$  con agitación constante durante 5 horas. El material que se obtuvo fué lavado 3 veces con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada y 3 veces con etanol absoluto, posteriormente se secó a  $37^\circ\text{C}$  durante 12 h.

#### VI.8 Caracterización de grupos funcionales de HA-Arg y HA-Glu

Para corroborar la presencia de los grupos funcionales característicos de HA y L-Arg, el biomaterial funcionalizado fue caracterizado mediante espectroscopía FTIR, con un equipo Perkin-Elmer Spectrum Two.

La estructura cristalina del material se observó mediante difracción de rayos X (DRX).

### VI.9 Liberación de L-Arg y L-Glu a pH=5

Para evaluar la liberación de aminoácidos en condiciones ácidas, se colocaron 50 mg de HA-Arg y 50 mg de HA-Glu, funcionalizadas durante la síntesis y después de la síntesis (post precipitación) en 10 mL de buffer acetato pH=5 (ácido acético 0.2M, acetato de sodio 0.2M) cada uno. Las muestras se colocaron en agitación constante en tiempos desde 1 hasta 11 días, retirando las muestras, filtrando y colectando el sobrenadante para la determinación de aminoácidos mediante el método de ninhidrina al terminar el período correspondiente a cada muestra, los tratamientos fueron realizados por triplicado para su posterior análisis estadístico.

### VI.10 Adsorción de L-Arg y L-Glu a HA

Con la finalidad de conocer la cantidad de aminoácidos adsorbidos en la superficie de la hidroxiapatita, el sobrenadante almacenado durante la funcionalización fue filtrado para eliminar las impurezas en la muestra. Posteriormente se determinó la concentración de L-Arg y L-Glu presente mediante el método de ninhidrina en el sobrenadante filtrado anteriormente.

### VI.11 Funcionalización con lactoferrina

Para funcionalizar la HA-Arg y HA-Glu con lactoferrina (Lf), se preparó una solución stock de Lf (Sigma-Aldrich) con una concentración de 10 mg/mL en buffer HEPES (0.01M HEPES, 0.15M NaCl). Posteriormente se colocaron alícuotas de 2 mL del stock previamente preparado, en tubos de centrifuga a 6 diferentes concentraciones (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/mL) y se añadieron 10 mg de la hidroxiapatita aminoacilada (HA-Arg o HA-Glu) en cada tubo, para después dejarlos en agitación vigorosa a 37 °C

durante 24 horas. El precipitado se recuperó por centrifugación y se lavó 6 veces con H<sub>2</sub>O desionizada.

#### VI.12 Isoterma de Langmuir

Se determinó la concentración de proteína en los sobrenadantes obtenidos de la funcionalización con Lf realizada a diferentes concentraciones (0,0.2,0.4,0.6,0.8 y 1 mg/mL) mediante lectura a 280 nm, los datos resultantes fueron utilizados para determinar la isoterma de adsorción de Langmuir, utilizando su ecuación no lineal:

$$q = q_{max} \frac{K_L C}{1 + K_L C}$$

En donde:

- q: capacidad de adsorción.
- q<sub>max</sub>: capacidad máxima de adsorción.
- K<sub>L</sub>: constante de Langmuir de afinidad.
- C: concentración de adsorbato en equilibrio.

#### VI.13 Isoterma de Freundlich

Se determinó la concentración de proteína en los sobrenadantes obtenidos de la funcionalización con Lf realizada a diferentes concentraciones (0,0.2,0.4,0.6,0.8 y 1 mg/mL) mediante lectura a 280 nm, los datos resultantes fueron utilizados para determinar la isoterma de adsorción de Freundlich, utilizando su ecuación no lineal:

$$q = K_F c^{1/n}$$

En donde:

- q: capacidad de adsorción,
- K<sub>F</sub>: constante de capacidad de adsorción.
- C: la concentración de adsorbato en equilibrio.

- n: constante de intensidad de adsorción.

#### VI.14 Caracterización de grupos funcionales de HA-Arg-Lf y HA-Glu-Lf

Para corroborar la presencia de los grupos funcionales característicos de HA y Lf, el biomaterial funcionalizado fue macerado con ayuda de un mortero de ágata hasta reducirlo a un polvo fino, mismo que fué caracterizado mediante FTIR con un equipo Perkin-Elmer Spectrum Two.

#### VI.15 Funcionalización con albúmina

Para funcionalizar la HA-Arg y HA-Glu con albúmina (BSA), se preparó una solución stock de albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich) con una concentración de 10 mg/mL en buffer HEPES (0.01M HEPES,0.15M NaCl). Posteriormente se colocaron alícuotas de 2 mL en tubos de centrifuga a 6 diferentes concentraciones (0,0.2,0.4,0.6,0.8 y 1 mg/mL) y se añadieron 10 mg de la hidroxapatita aminoacilada (HA-Arg o HA-Glu) en cada tubo, para después dejarlos en agitación vigorosa a 37 °C durante 24 horas. El precipitado se recuperó por centrifugación y se lavó 6 veces con H<sub>2</sub>O desionizada.

#### VI.16 Isotherma de Langmuir

Se determinó la concentración de proteína en los sobrenadantes obtenidos de la funcionalización con BSA realizada a diferentes concentraciones (0,0.2,0.4,0.6,0.8 y 1 mg/mL) mediante lectura a 280 nm, los datos resultantes fueron utilizados para determinar la isoterma de adsorción de Langmuir utilizando la ecuación no lineal descrita en el apartado VI.11.

#### VI.17 Isotherma de Freundlich

Se determinó la concentración de proteína en los sobrenadantes obtenidos de la funcionalización con BSA realizada a diferentes concentraciones (0,0.2,0.4,0.6,0.8 y 1 mg/mL) mediante lectura a 280 nm, los datos resultantes fueron utilizados para determinar la isoterma de adsorción de Freundlich utilizando la ecuación no lineal descrita en el apartado VI.12.

#### VI.18 Caracterización de grupos funcionales de HA-Arg-BSA y HA-Glu-BSA

Para corroborar la presencia de los grupos funcionales característicos de HA y BSA, el biomaterial funcionalizado fue caracterizado mediante FTIR con un equipo Perkin-Elmer Spectrum Two.

#### VI.19 Liberación de L-Arg, L-Glu, Lf y BSA en fluido fisiológico

Se colocaron 50 mg de HA-Arg y 50 mg de HA-Glu, en 10 mL de fluido fisiológico simulado (SBF) cada uno (Kokubo & Takadama, 2006). A su vez, 10 mg de HA-Arg-Lf, 10 mg de HA-Glu-Lf, 10 mg de HA-Arg-BSA y 10 mg de HA-Glu-BSA fueron suspendidos en 2 mL de SBF cada uno. Las muestras se colocaron en agitación constante en tiempos desde 1 hasta 11 días, retirando las muestras, filtrando y colectando el sobrenadante para la determinación de aminoácidos al terminar el período correspondiente a cada muestra. Se determinó la concentración de aminoácidos en el sobrenadante mediante el método espectrofotométrico de ninhidrina, y de proteínas mediante lectura a 280 nm, los tratamientos fueron realizados por triplicado para su posterior análisis estadístico.

#### VI.20 Análisis estadístico

Para determinar las diferencias de liberación de aminoácidos que hay entre los diferentes tipos de funcionalización y condiciones de pH, se realizaron pruebas de Tukey utilizando Minitab 18 ( $\alpha=95\%$ ), con las que se compararon las medias de

liberación de aminoácidos obtenidas de cada tratamiento, los cuales fueron realizados por triplicado.

## VII. Resultados

### VII.1 Caracterización de HA

#### VII.1.1 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 5, se puede observar una comparación entre los espectros que se obtuvieron para la HA comercial (Sigma-Aldrich) y la HA que se obtuvo mediante el tratamiento 1 (3 horas de reacción con  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , sin digestión previa con  $\text{HNO}_3$ ), los grupos funcionales identificados fueron:  $\text{OH}^-$  a  $1641$  y  $602$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  a  $1418$  y  $873$   $\text{cm}^{-1}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  a  $1029$  y  $564$   $\text{cm}^{-1}$ , mismos que han sido reportados como característicos de la HA en trabajos previos (Reyes-Gasga et al., 2013).

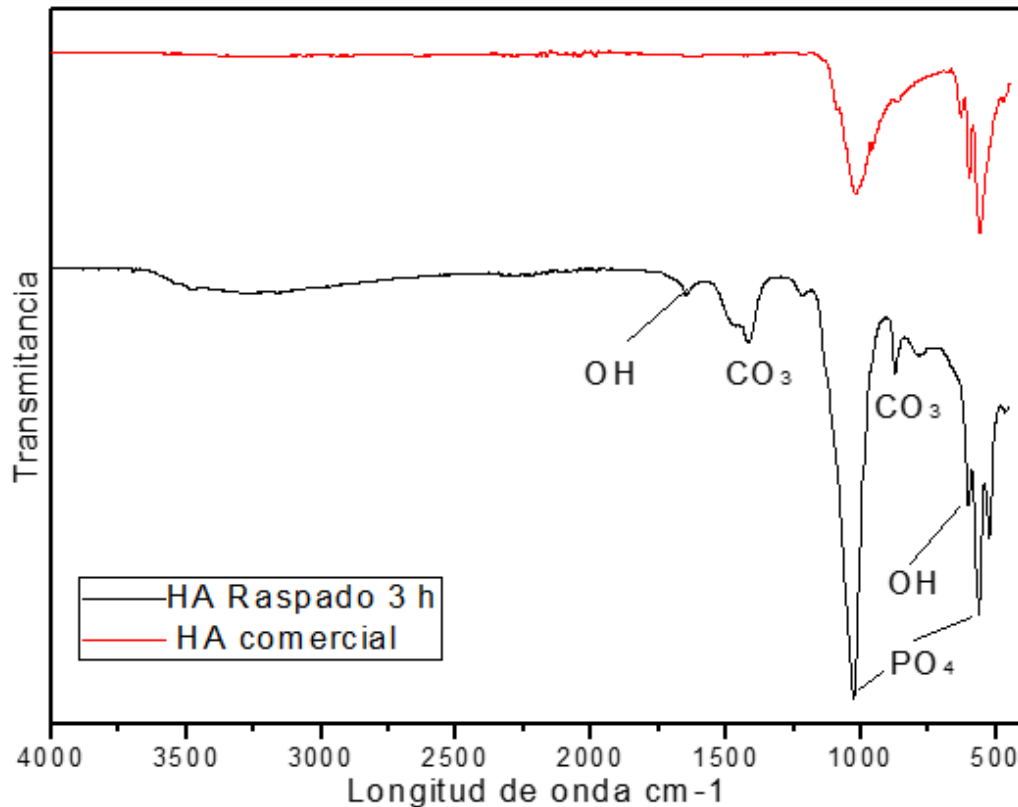


Figura 5. Espectro FTIR de la HA que se obtuvo a partir del tratamiento 1 y espectro de HA comercial. Se observan los picos característicos de los grupos funcionales esperados de HA:  $PO_4^{3-}$  y  $OH^-$ , así como los picos de grupos  $CO_3^{2-}$  no deseados. Espectro FTIR de la HA que se obtuvo a partir del tratamiento 1 y espectro de HA comercial. Se observan los grupos funcionales esperados característicos de HA:  $PO_4^{3-}$  y  $OH^-$ , así como grupos  $CO_3^{2-}$  no deseados.

Para el tratamiento 2 (18 horas de reacción con  $H_3PO_4$ , sin digestión previa con  $HNO_3$ ), se identificaron los grupos funcionales:  $OH^-$  a  $601.27$ ,  $PO_4^{3-}$  a  $1030$  y  $562$  y  $CO_3^{2-}$  a  $1450\text{ cm}^{-1}$  (Reyes-Gasga et al., 2013) (Figura 6).

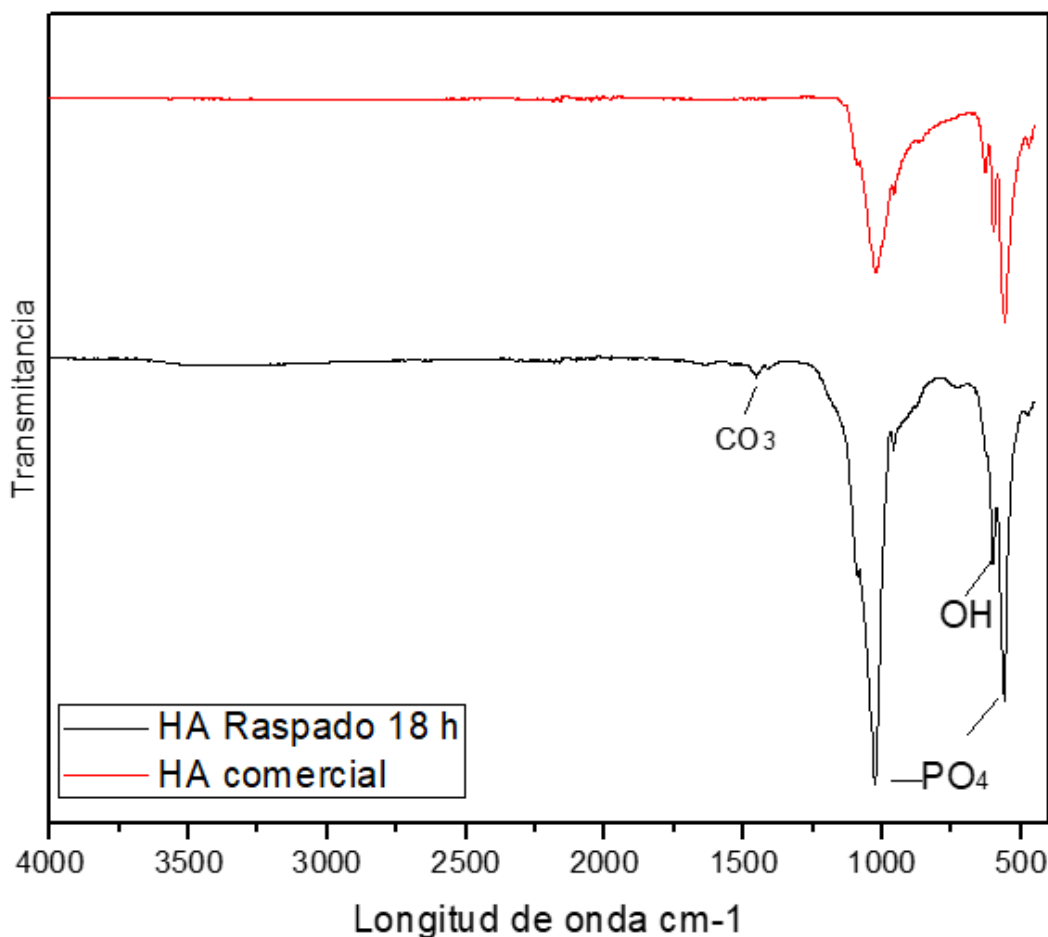


Figura 6. Espectro FTIR de la HA obtenida del tratamiento 2 y de HA comercial, se pueden observar los picos característicos de los grupos funcionales esperados de la HA:

$PO_4^{3-}$  y  $OH$ , así como los picos de grupos  $CO_3^{2-}$  no deseados con menor intensidad con respecto al tratamiento 1.

En cuanto al tratamiento 3 (36 horas de reacción con  $H_3PO_4$ , sin digestión previa con  $HNO_3$ ), se identificaron los grupos:  $OH^-$  a  $600.5$  y  $PO_4^{3-}$  a  $1029.32$  y  $554$   $cm^{-1}$  (Reyes-Gasga et al., 2013) (Figura 7).

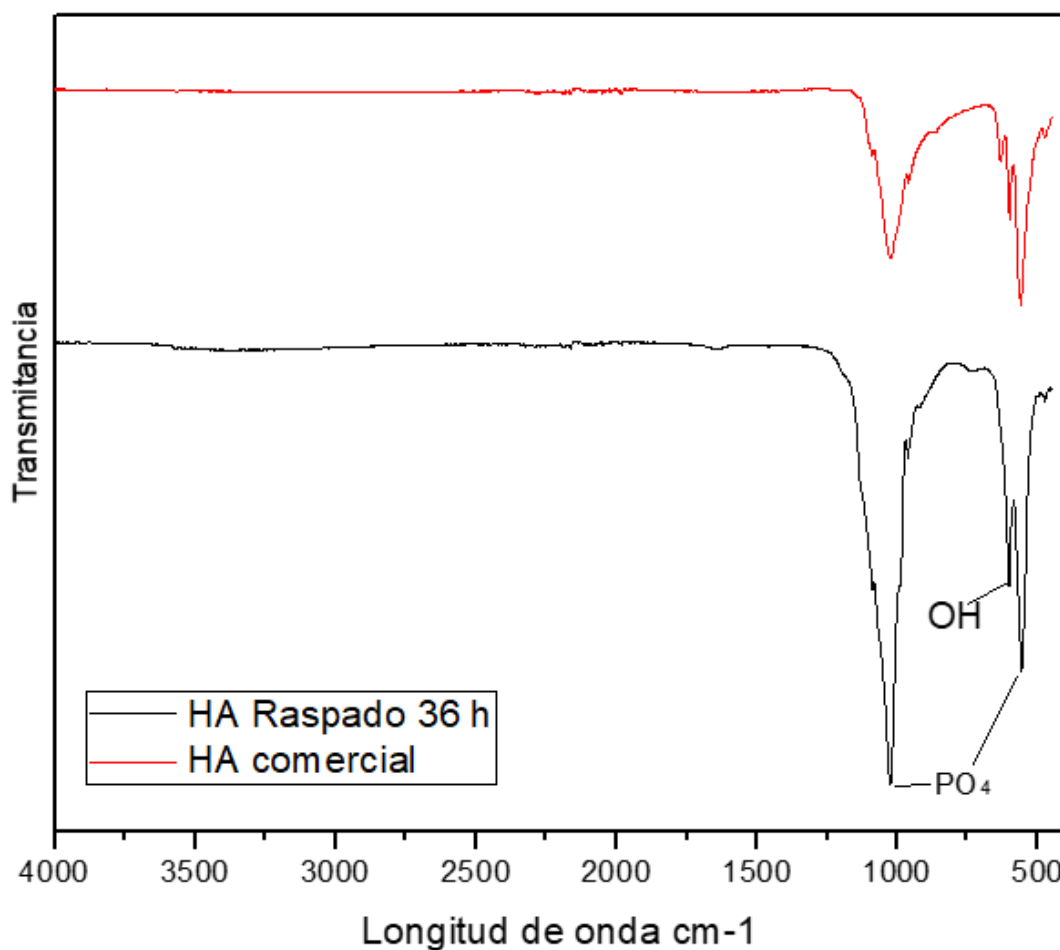


Figura 7. Espectro FTIR de la HA obtenida del tratamiento 3 y de HA comercial, se pueden observar los picos característicos de los grupos funcionales esperados de HA:  $PO_4^{3-}$  y  $OH$ , mientras que los grupos  $CO_3^{2-}$  no deseados no aparecen, en contraste con los tratamientos 1 y 2.

El tratamiento 4 (3 horas de reacción con  $H_3PO_4$ , con digestión previa con  $HNO_3$ ) fue aplicado a las 3 fracciones (raspado, molido y completo), y se identificaron los grupos funcionales característicos de la HA (Reyes-Gasga et al., 2013), como se muestra en la Figura 8.

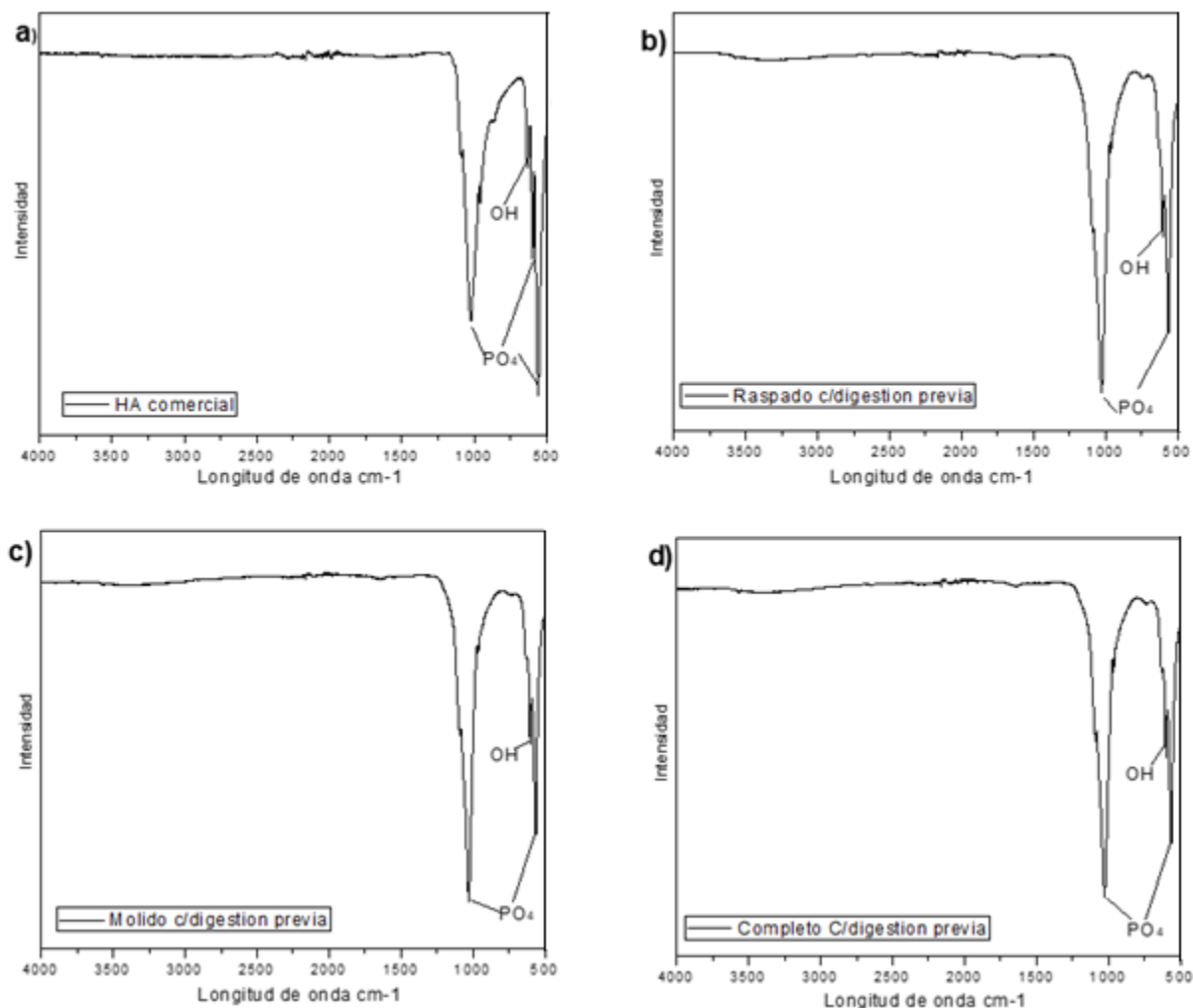


Figura 8. Espectros FTIR de la HA obtenida del tratamiento 4., en el inciso a) se muestra el espectro de la HA comercial con los picos de sus grupos funcionales característicos:  $PO_4^{3-}$  a 560, 1025.09 y 601.27  $cm^{-1}$  y OH a 630.5  $cm^{-1}$  (Reyes-Gasga et al., 2013), en los incisos b), c) y d), se observan los espectros de los materiales que se obtuvieron del raspado, molido y completo respectivamente, todos realizados con una digestión previa con  $HNO_3$ , en los cuales se puede apreciar la presencia de los grupos funcionales característicos de la HAP:  $PO_4^{3-}$  y OH.

### VII.1.2 Difracción de rayos X (DRX)

En los resultados de DRX de la HA obtenida del raspado después de 3 h de reacción, se pueden observar los picos característicos de la brushita (tarjeta JCPDS número 72-0713) (Huang & Cao, 2016) que se encuentran a  $2\Theta=11.59^\circ$ ,  $20.97^\circ$  y  $29.31^\circ$ , que corresponden a los planos cristalinos (020), (121) y (141) respectivamente, como se puede observar en la Figura 9.

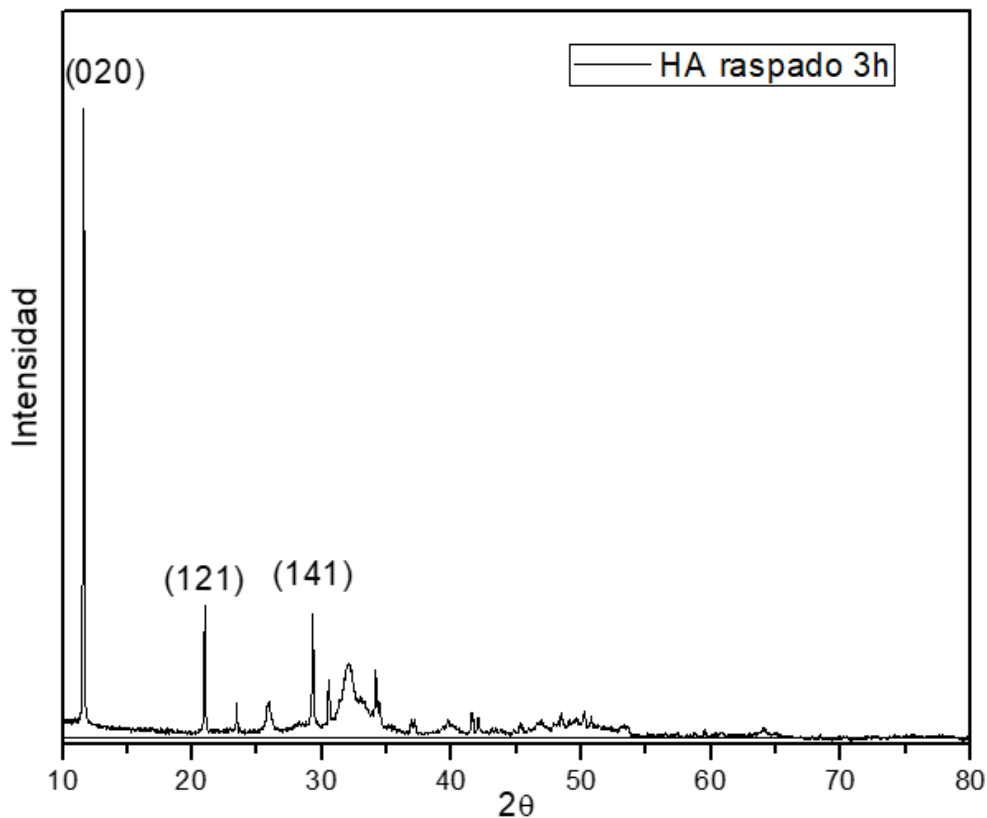


Figura 9. Espectro de DRX de HA obtenida con el tratamiento 1, en el que se muestran los picos característicos de la brushita con sus respectivos planos cristalinos.

En cuanto a la HA que se obtuvo del raspado con 18 h de reacción, se identificaron los picos característicos de HA (tarjeta JCPDS número 9-432) (M.-C. Wang

et al., 2015), mismos que se encuentran localizados a un valor de  $2\theta = 25.94^\circ$ ,  $31.75^\circ$ ,  $32.78^\circ$ ,  $34.13^\circ$ ,  $46.70^\circ$  y  $49.37^\circ$ , que corresponden a los planos cristalinos (002), (211), (300), (310), (222), y (213), respectivamente, como se aprecia en la Figura 10.

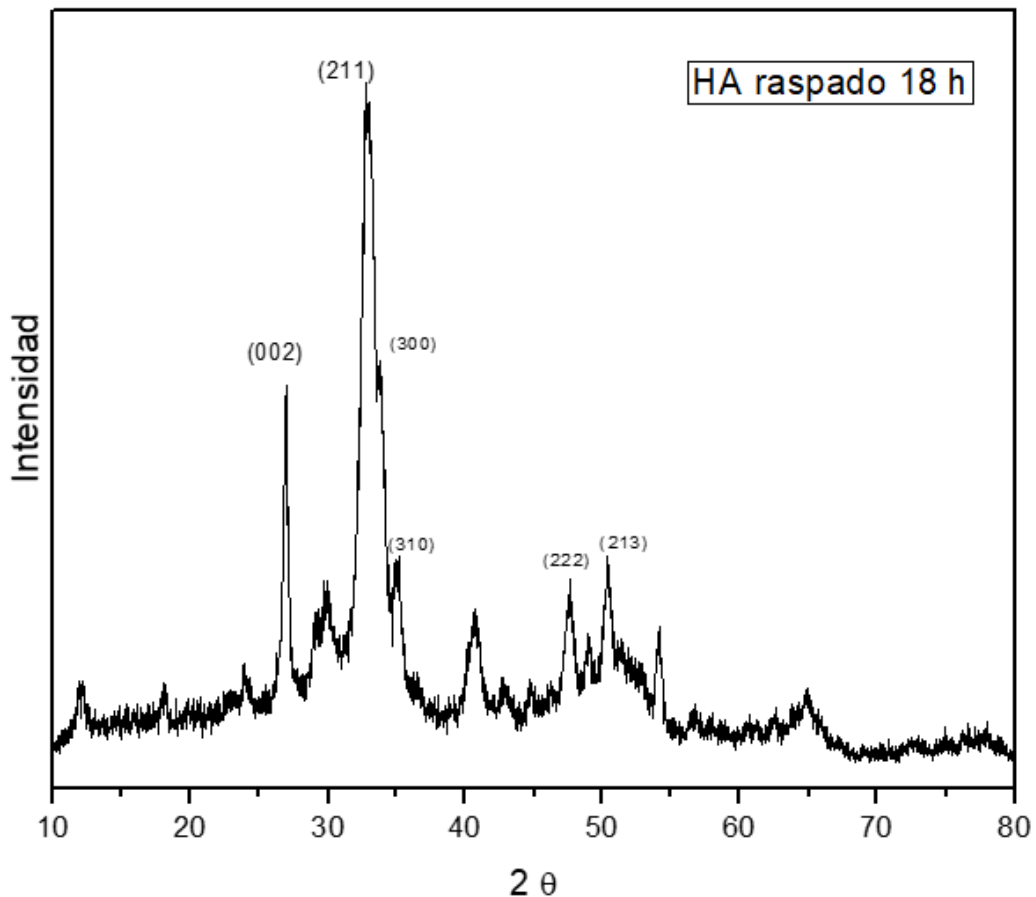


Figura 10. Espectro de DRX de la HA obtenida con el tratamiento 2, en el que se muestran los picos característicos de la hidroxiapatita con sus respectivos planos cristalinos.

Los análisis de DRX de la HA del raspado con 36 h de reacción, muestran que en el material sintetizado, se lograron identificar únicamente los 3 principales picos característicos de la HA (tarjeta JCPDS número 9-432) (M.-C. Wang et al., 2015), mismos que se encuentran localizados a un valor de  $2\theta = 25.93^\circ$ ,  $31.95^\circ$  y  $32.64^\circ$ , que corresponden a los planos cristalinos (002), (211) y (300) (Figura 11).

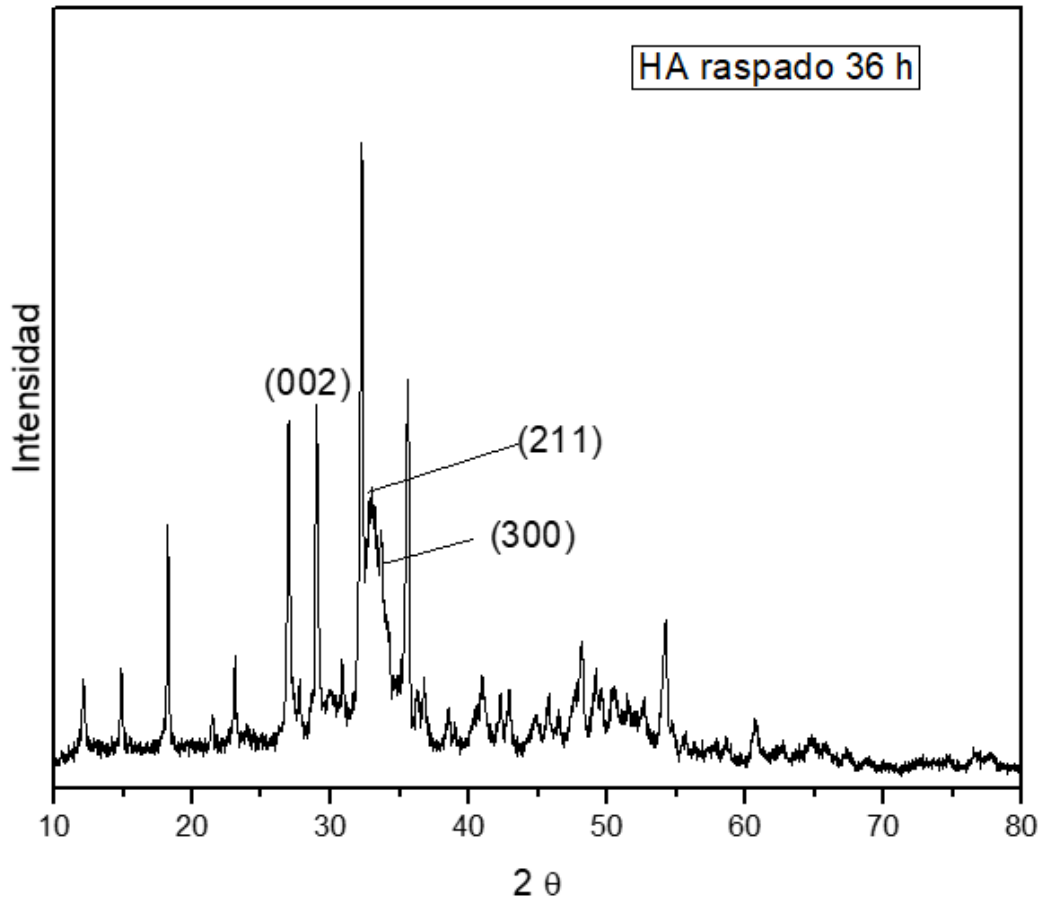


Figura 11. Espectro de DRX de la HA obtenida con el tratamiento 3, en el que se muestran los picos característicos que se identificaron de la hidroxiapatita con sus respectivos planos cristalinos.

Para la HA obtenida que se obtuvo a partir de  $\text{CaCO}_3$  comercial y las 3 fracciones (raspado, molido y completo) con 3 horas de reacción, sometidas a una digestión previa con  $\text{HNO}_3$ , los resultados de DRX muestran lo siguiente: para la muestra obtenida del raspado, se identificaron los picos característicos de HA (tarjeta JCPDS número 9-432) (M.-C. Wang et al., 2015), mismos que se encuentran localizados a un valor de  $2\theta = 26^\circ$ ,  $31.75^\circ$ ,  $32.20^\circ$ ,  $34.73^\circ$ ,  $46.78^\circ$  y  $49.47^\circ$ , que corresponden a los planos cristalinos (002), (211), (300), (310), (222), y (213), respectivamente. Para la muestra obtenida del molido,

se identificaron los picos característicos de HA (tarjeta JCPDS número 9–432) (M.-C. Wang et al., 2015), mismos que se encuentran localizados a un valor de  $2\theta = 25.94^\circ$ ,  $31.75^\circ$ ,  $32.78^\circ$ ,  $33.99^\circ$ ,  $46.64^\circ$  y  $49.47^\circ$ , que corresponden a los planos cristalinos (002), (211), (300), (310), (222), y (213), respectivamente. Para la muestra obtenida del exoesqueleto completo, se identificaron los picos característicos de HA (tarjeta JCPDS número 9–432) (M.-C. Wang et al., 2015), que se encuentran localizados a un valor de  $2\theta = 25.94^\circ$ ,  $31.89^\circ$ ,  $32.78^\circ$ ,  $33.97^\circ$ ,  $46.49^\circ$  y  $49.31^\circ$ , que corresponden a los planos cristalinos (002), (211), (300), (310), (222), y (213), respectivamente. En cuanto a la muestra obtenida a partir de  $\text{CaCO}_3$  comercial, se identificaron los picos característicos de HA (tarjeta JCPDS número 9–432) (M.-C. Wang et al., 2015), que se encuentran localizados a un valor de  $2\theta = 25.94^\circ$ ,  $31.75^\circ$ ,  $32.78^\circ$ ,  $33.97^\circ$ ,  $46.64^\circ$  y  $49.31^\circ$ , correspondientes a los planos cristalinos (002), (211), (300), (310), (222), y (213), respectivamente (Figura 12)

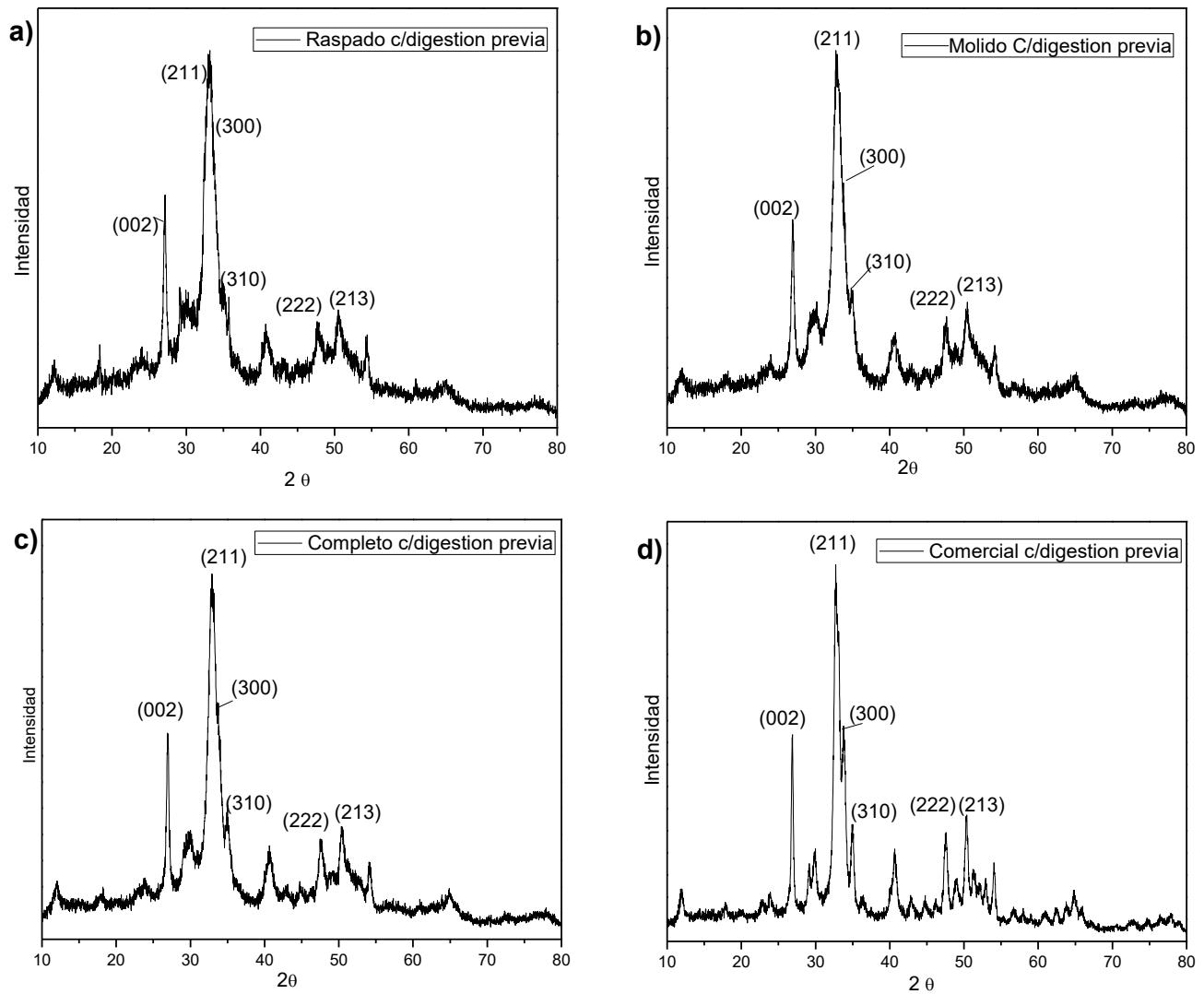
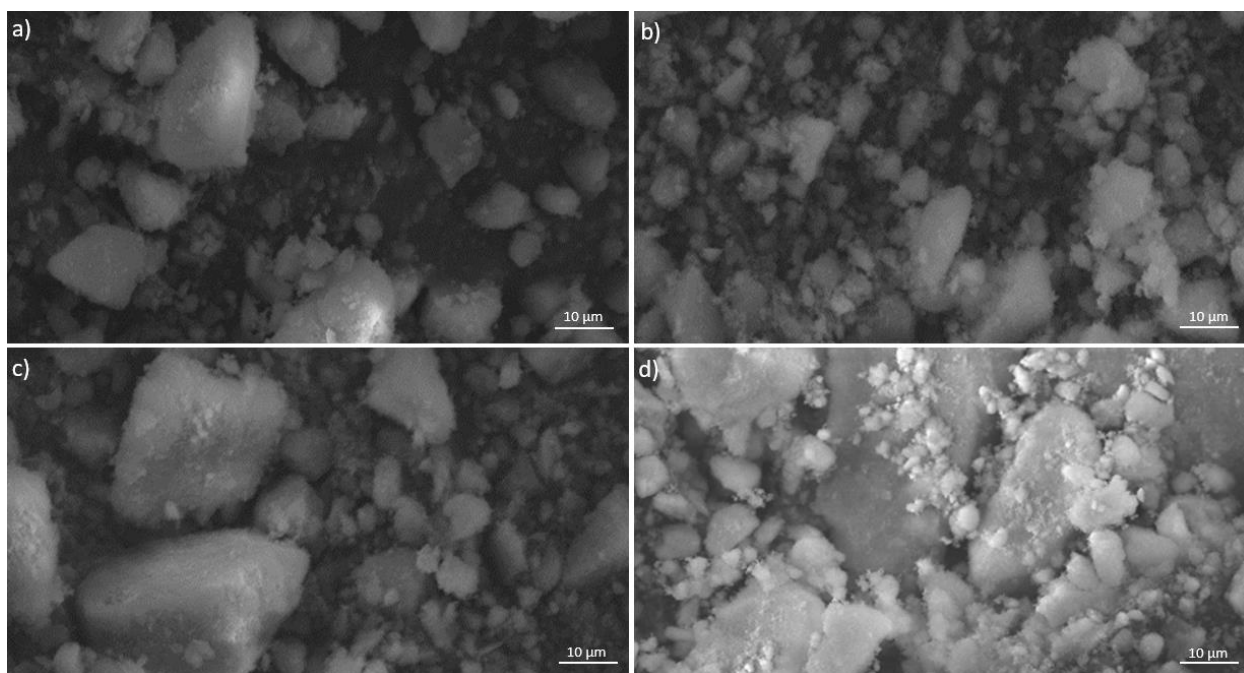


Figura 12. Espectros de DRX de HA obtenida con el tratamiento 4 y  $\text{CaCO}_3$  comercial, los incisos **a)**, **b)**, **c)** y **d)**, corresponden a las muestras obtenidas de los polvos provenientes del exoesqueleto raspado, molido, completo y  $\text{CaCO}_3$  comercial respectivamente. Se muestran los picos característicos que se lograron identificar de la hidroxiapatita con sus planos cristalinos.

### VII.1.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las micrografías SEM (Figura 13) muestran la morfología heterogénea y el tamaño de cristal de las muestras que se obtuvieron a partir del exoesqueleto completo a los diferentes tiempos de reacción (3, 18 y 36 horas) y con digestión previa de la materia prima.



*Figura 13. Micrografías SEM tomadas a x2000 para a) 3, b) 18, c) 36 horas y d) síntesis con digestión previa de la materia prima con HNO<sub>3</sub> respectivamente. Las únicas muestras que contienen HA son **b)** y **c)**.*

### VII.1.4 Espectroscopía de dispersión de energía (EDS)

Los datos que se obtuvieron del análisis EDS, muestran que los elementos presentes en las muestras de las cuales se obtuvo HA (Tratamientos 2 y 4) son Ca, P, Mg, O y C con una relación Ca/P de 1.73 para el tratamiento 2 y 1.68 para el tratamiento 4 (Figura 14).

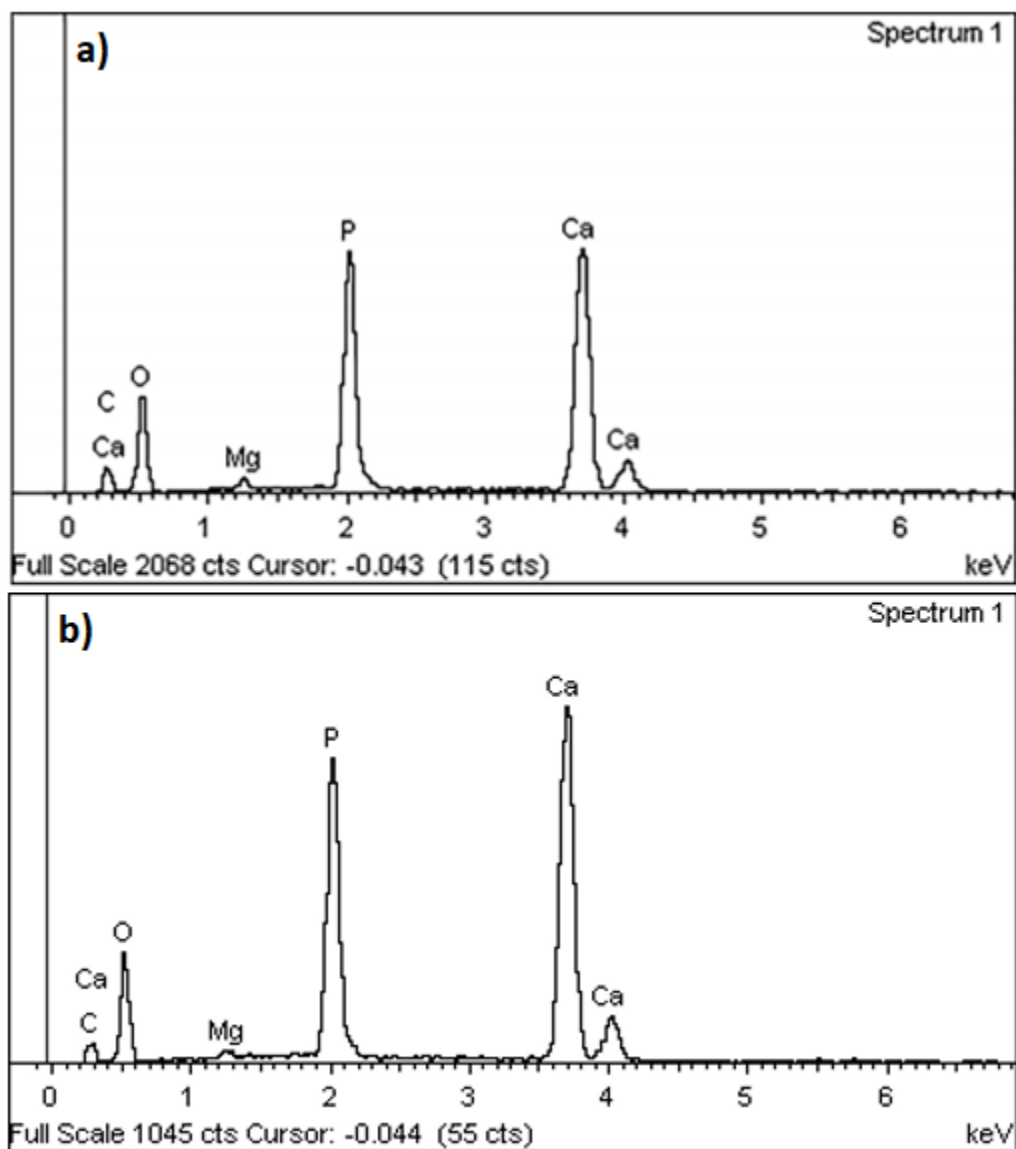


Figura 14. Espectros de energía dispersiva de HA obtenida a 18 horas de tiempo de reacción a) y con digestión previa con HNO<sub>3</sub> b).

### VII.1.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La Figura 15 muestra las micrografías TEM de la HA obtenida a 18 horas de reacción con  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , con esta resolución se pueden observar nano cristales con bordes irregulares y una tendencia a aglomerarse. En el recuadro de la Figura 15 se puede observar el patrón de difracción de electrones del área seleccionada (SAED), mismo que revela la naturaleza cristalina del material.

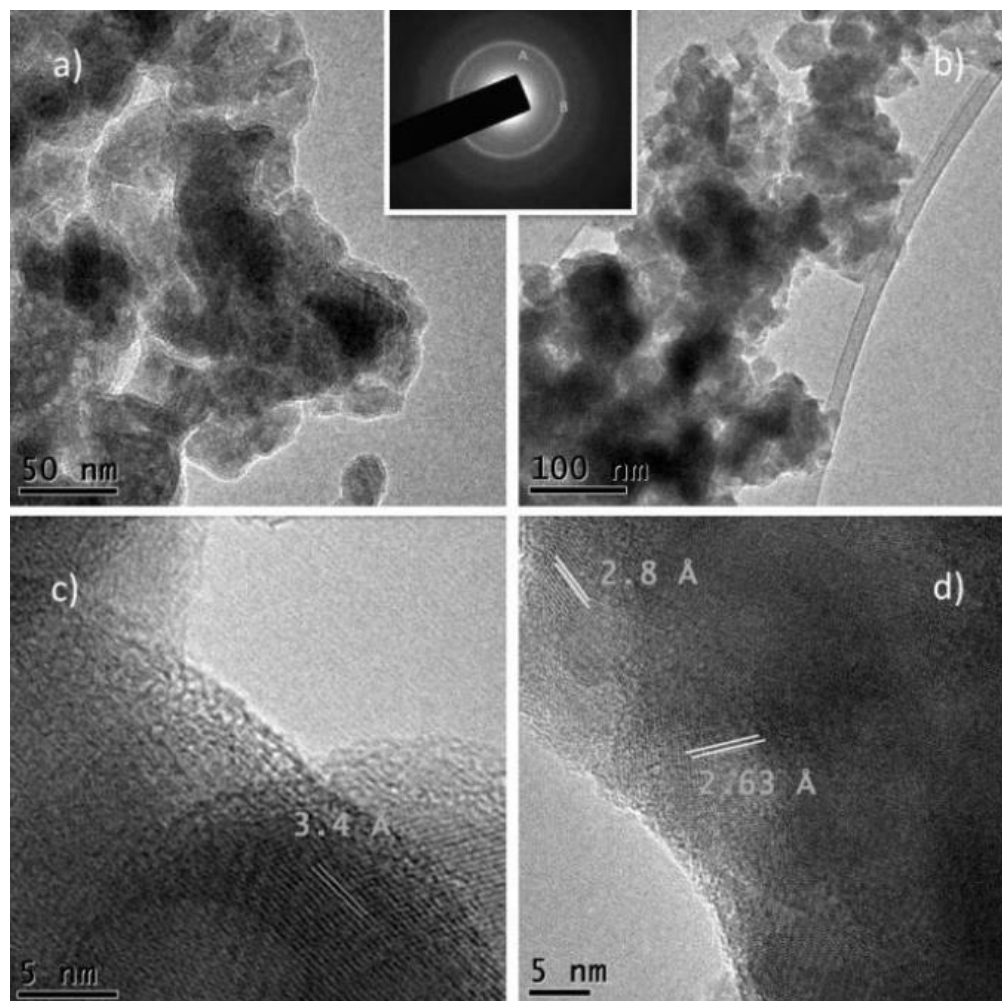


Figura 15. Micrografías TEM de la HA obtenida para el tratamiento 2, en **a)** y **b)** se observa la morfología heterogénea del material, **c)** y **d)** muestran las micrografías HRTEM del borde del material, el recuadro superior muestra el patrón SAED correspondiente a la HA.

La Figura 16 muestra las micrografías TEM y HRTEM de la HA obtenida por el tratamiento 4 (digestión previa con  $\text{HNO}_3$ ). Se pueden observar nano cristales con bordes irregulares y de igual manera una tendencia a aglomerarse. En el recuadro de la Figura 16 se puede observar el patrón de difracción de electrones del área seleccionada (SAED), mismo que revela la naturaleza cristalina del material.

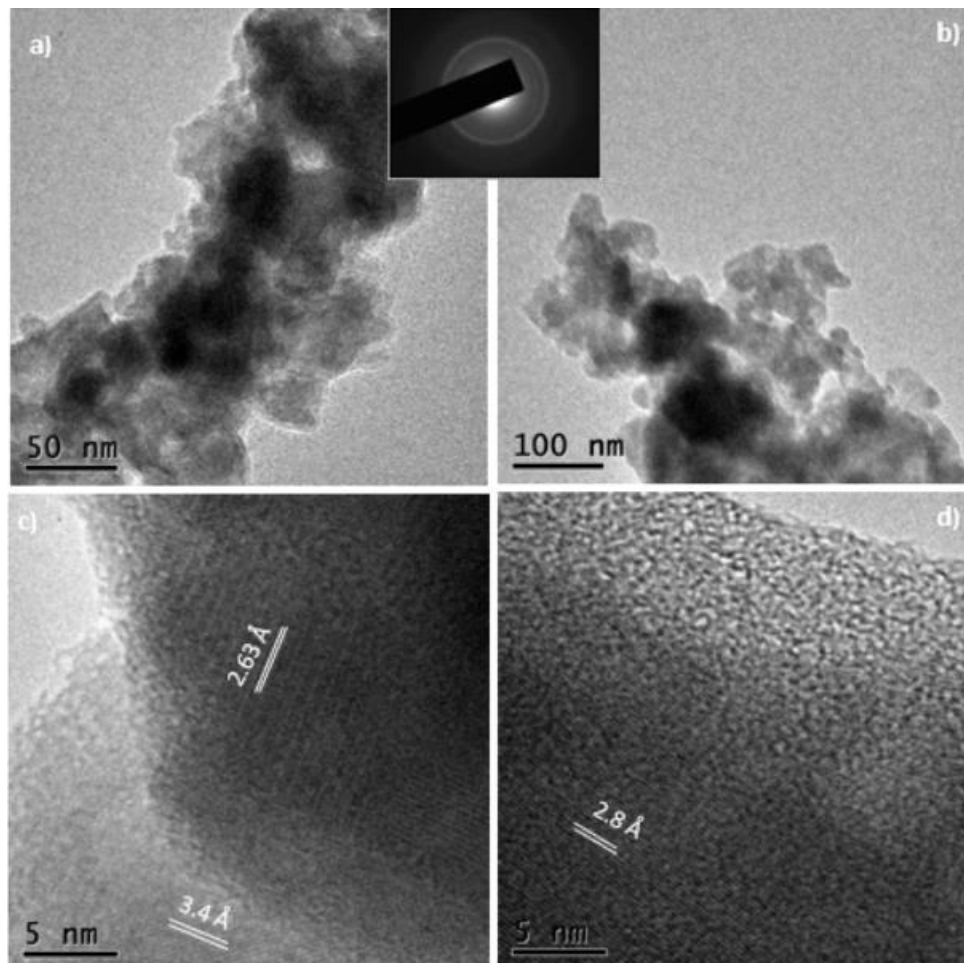


Figura 16. Micrografías TEM de la HA obtenida para el tratamiento 4, en **a)** y **b)** se observa la morfología heterogénea del material, **c)** y **d)** muestran las micrografías HRTEM del borde del material, el recuadro superior muestra el patrón SAED correspondiente a la HA.

## VII.2 Funcionalización de HA

### VII.2.1 Caracterización de grupos funcionales de HA-Arg y HA-Glu

Los espectros FTIR de la funcionalización realizada con L-Arg y con L-Glu muestran los picos de los grupos funcionales:  $\text{PO}_4^{3-}$  a 560, 1025.09 y 601.27  $\text{cm}^{-1}$  y OH<sup>-</sup> a 630.5  $\text{cm}^{-1}$ . Adicionalmente se pueden apreciar los picos característicos de los grupos funcionales C=O a 1650 y  $\text{NH}_2$  a 1450 (Figura 17).

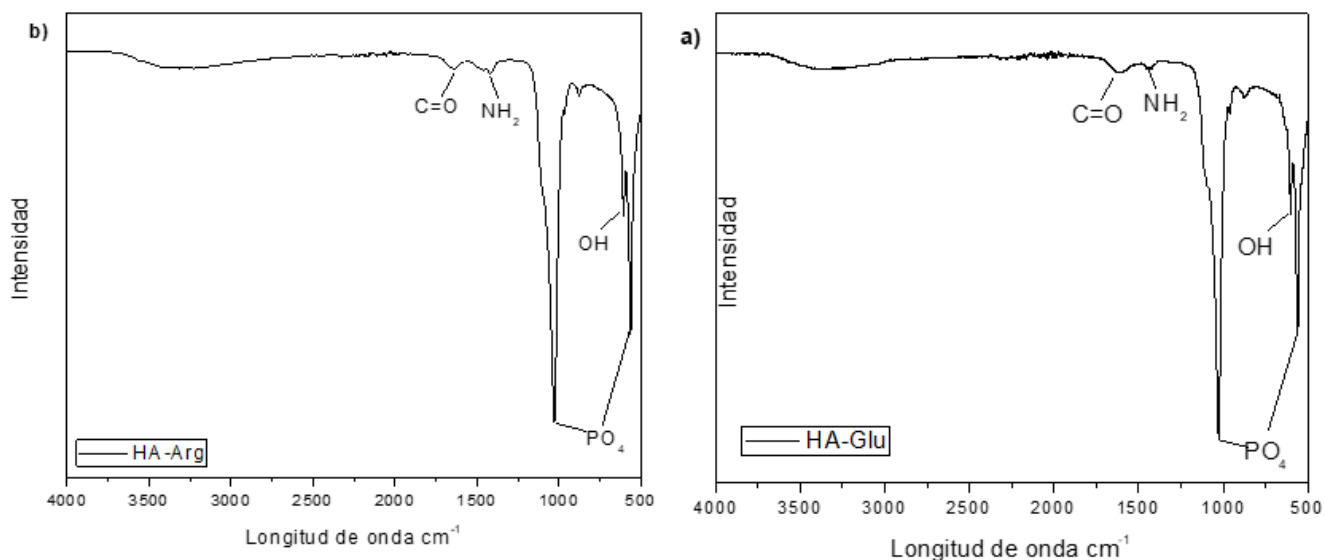


Figura 17. Espectro FTIR de HA funcionalizada con L-Arg a). Espectro FTIR de HA funcionalizada con L-Glu b). Ambas muestras presentan sus grupos funcionales característicos adicionales a los grupos  $\text{NH}_2$  y C=O, característicos de los aminoácidos.

En los espectros de DRX, se identificaron los picos característicos de la HA (tarjeta JCPDS número 9-432), mismos que se encuentran localizados a un valor de  $2\theta = 26^\circ$ ,  $31.75^\circ$ ,  $32.20^\circ$ ,  $34.73^\circ$ ,  $46.78^\circ$  y  $49.47^\circ$ , que corresponden a los planos cristalinos (002), (211), (300), (310), (222), y (213), respectivamente (Figura 18).

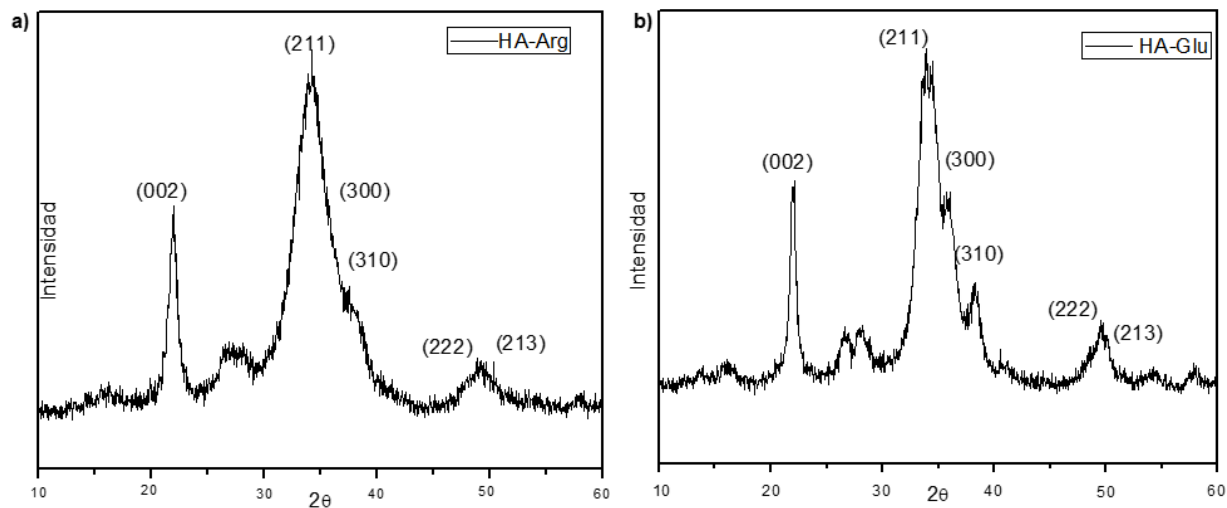


Figura 18. Espectro de DRX de la HA funcionalizada con L-Arg a). Espectro de DRX de la HA funcionalizada con L-Glu b). Se muestran los picos característicos que se identificaron, con sus respectivos planos cristalinos.

#### VII.2.2 Liberación de L-Arg de HA derivada de erizo y HA comercial funcionalizadas después de la síntesis a pH=5.

Tras realizar la funcionalización de HA comercial (Sigma-aldrich) y HA derivada de erizo morado después de haber sido sintetizada, las muestras se colocaron en agitación en buffer acetato con pH=5 para evaluar la liberación de L-Arg; Sin embargo, no se detectó liberación de a.a. en ninguna de las dos muestras.

En la Figura 19 se pueden observar las gráficas de la liberación de L-Arg de la HA funcionalizada durante la precipitación (sintetizada a partir de CaCO<sub>3</sub> comercial y a partir de erizo morado) y la HA funcionalizada después de la síntesis (HA comercial (Sigma-Aldrich) y sintetizada a partir de erizo morado). Para evaluar si existen diferencias significativas entre la liberación de L-Arg de la HA funcionalizada durante la síntesis y la HA funcionalizada después de la síntesis (post precipitación), se realizó una prueba de

Tukey comparando las medias de liberación de aminoácidos (N=11) obtenidas de cada tratamiento, para lo cual, se utilizó el programa Minitab 18 (Tabla 3, Figura 20).

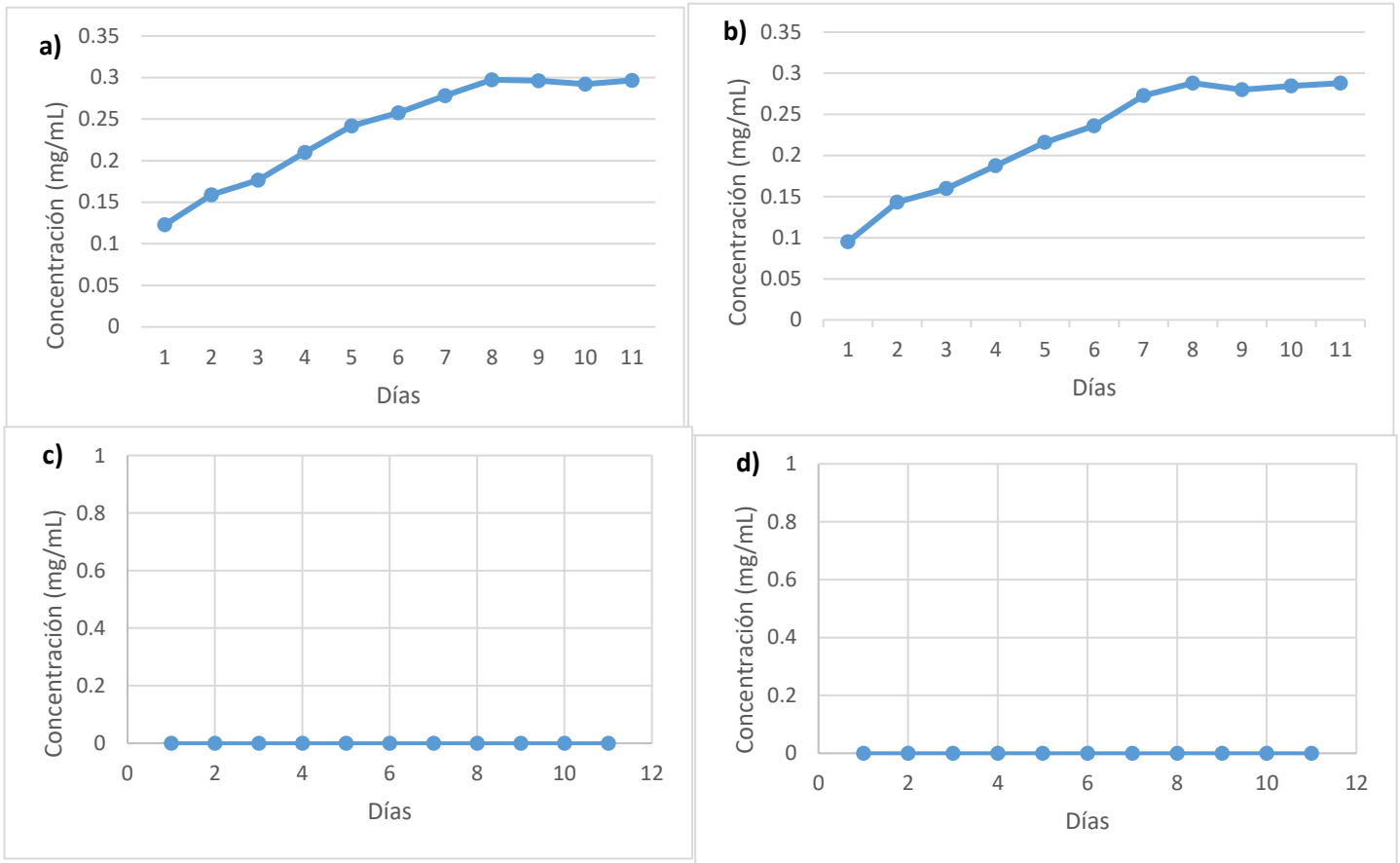


Figura 19. Liberación de L-Arg a lo largo de 11 días a pH=5, comparación entre HA sintetizada a partir de exoesqueleto de erizo y funcionalizada durante la síntesis (a), HA sintetizada a partir de CaCO<sub>3</sub> comercial y funcionalizada durante la síntesis (b), HA sintetizada a partir de erizo y funcionalizada después de la síntesis (c), y HA comercial funcionalizada (d).

Tabla 3. Prueba de Tukey de la liberación de L-Arg ( $\alpha=95\%$ ) en pH=5.0.

Hidroxiapatita	N	Medias de liberación de a.a.	Agrupación
CaCO <sub>3</sub>	11	0.2390 mg/mL	A
Erizo morado	11	0.2228 mg/mL	A
Post prec.	11	0.000000 mg/mL	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

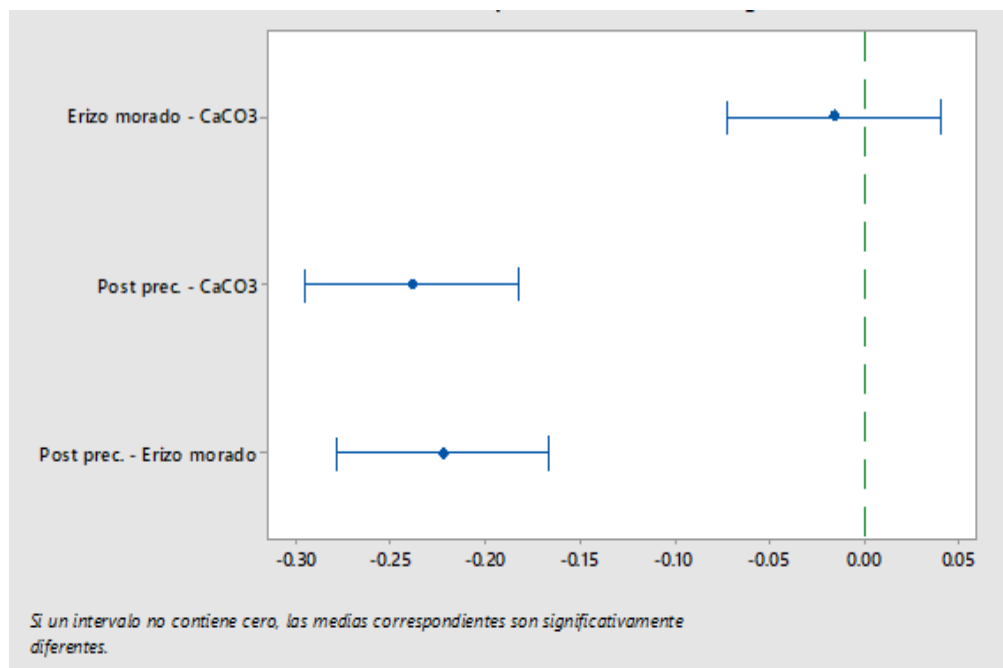


Figura 20. Liberación de L-Arg en pH=5. Diferencias entre las medias de cada HA funcionalizada durante la síntesis (Erizo morado y CaCO<sub>3</sub>) y la HA funcionalizada después de la síntesis (Post prec.).  $\alpha=95\%$ .

### VII.2.3 Liberación de L-Glu de HA derivada de erizo y HA comercial a pH=5.

Después de realizar la funcionalización después de la síntesis de HA comercial (Sigma-aldrich) y HA derivada de erizo morado, las muestras se colocaron en agitación tanto en fluido fisiológico como en buffer acetato con pH=5 para evaluar la liberación de L-Glu; Sin embargo, no se detectó liberación de aminoácidos en ninguna de las dos muestras.

En la Figura 21 se puede observar la comparación de la liberación de L-Glu entre la HA funcionalizada durante la precipitación (sintetizada a partir de  $\text{CaCO}_3$  comercial y a partir de erizo morado) y la HA funcionalizada post precipitación (HA comercial (Sigma-Aldrich) y sintetizada a partir de erizo morado). Para evaluar si existen diferencias significativas entre la liberación de L-Glu de la HA funcionalizada durante la síntesis y la HA funcionalizada post precipitación, se realizó una prueba de Tukey comparando las medias de liberación de aminoácidos (N=11) obtenidas de cada tratamiento, para lo cual, se utilizó el programa Minitab 18 (Tabla 4, Figura 22).

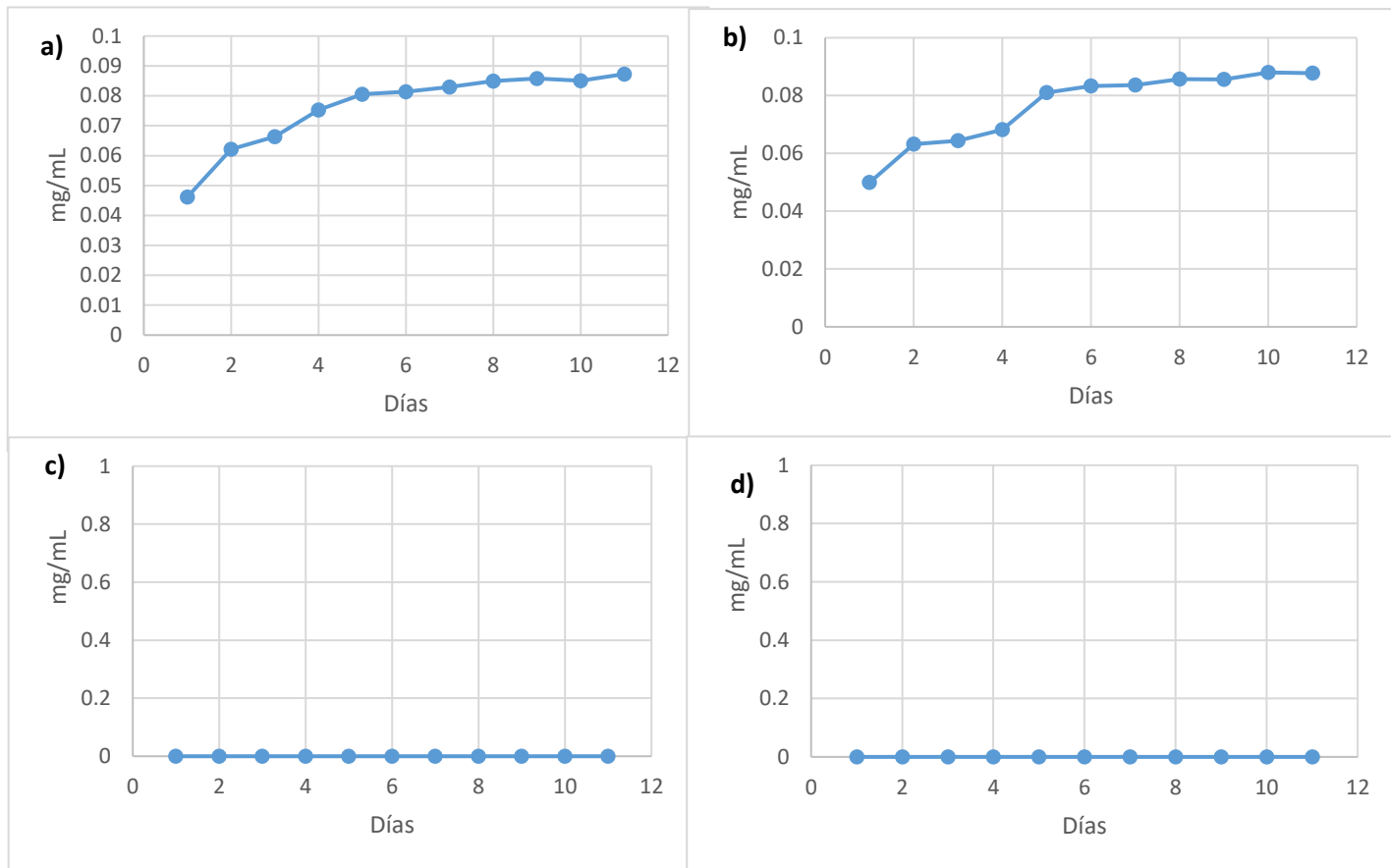


Figura 21. Liberación de L-Glutamato a lo largo de 11 días a pH=5, comparación entre HA sintetizada a partir de exoesqueleto de erizo y funcionalizada durante la síntesis (a), HA sintetizada a partir de CaCO<sub>3</sub> comercial y funcionalizada durante la síntesis (b), HA sintetizada a partir de erizo y funcionalizada post-precipitación (c), y HA comercial funcionalizada post-precipitación (d).

Tabla 4. Prueba de Tukey de la liberación de L-Glutamato ( $\alpha=95\%$ ) en pH=5.0.

Hidroxiapatita	N	Medias de liberación de a.a.	Agrupación
Erizo morado	11	0.07641	A
CaCO <sub>3</sub>	11	0.07617	A
Post prec.	11	0.000000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

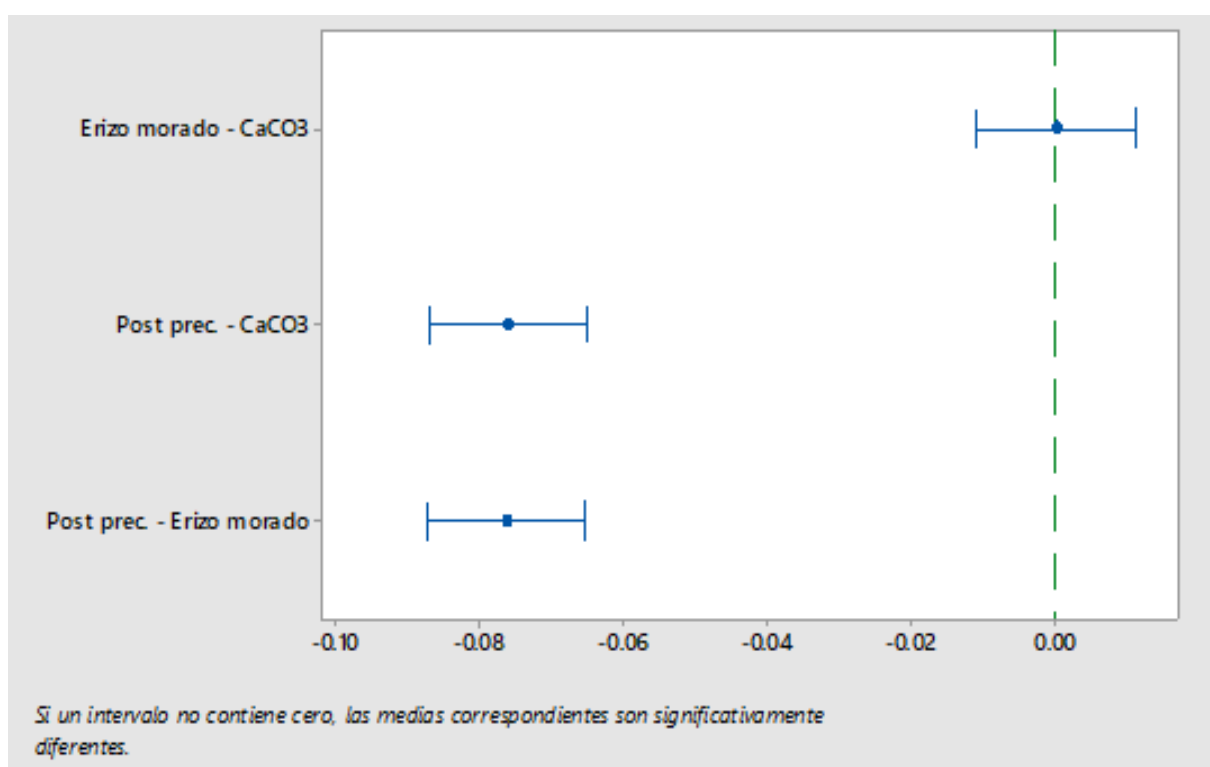


Figura 22. Liberación de L-Glu en pH=5. Diferencias entre las medias de cada HA funcionalizada durante la síntesis (Erizo morado y CaCO<sub>3</sub>) y la HA funcionalizada post-precipitación (Post prec.).  $\alpha=95\%$ .

#### VII.2.4 Determinación de cantidad de L-Arg adsorbida a la HA

La determinación de la cantidad de L-Arg adsorbida a la hidroxiapatita, cuantificada mediante el método de la ninhidrina fue de  $60.59 \pm 1.6$  mgArg/gHA (Figura 23), la cantidad de HA-Arg obtenida fue de 2.058 g.

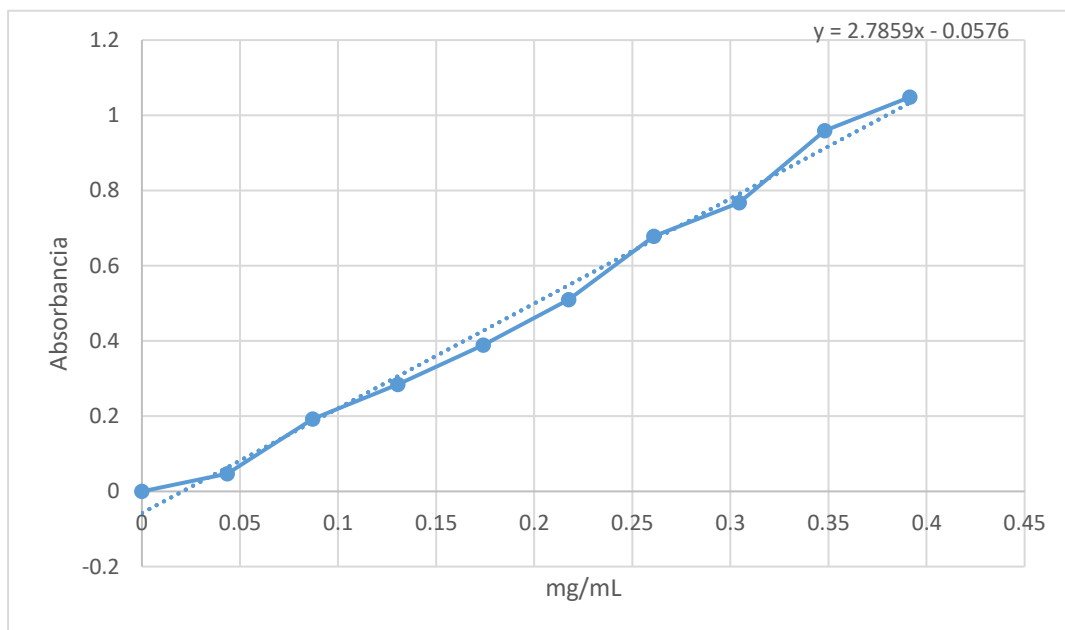


Figura 23. Curva de calibración para la determinación de L-Arg.  $R^2=0.99$ .

#### VII.2.5 Determinación de cantidad de L-Glu adsorbida a la HA

La determinación de la cantidad de L-Glu que se adsorbió a la hidroxiapatita, fue de  $52.61 \pm 0.92$  mgGlu/gHA, (Figura 24) la cantidad de HA-Glu obtenida fue de 1.78 g.

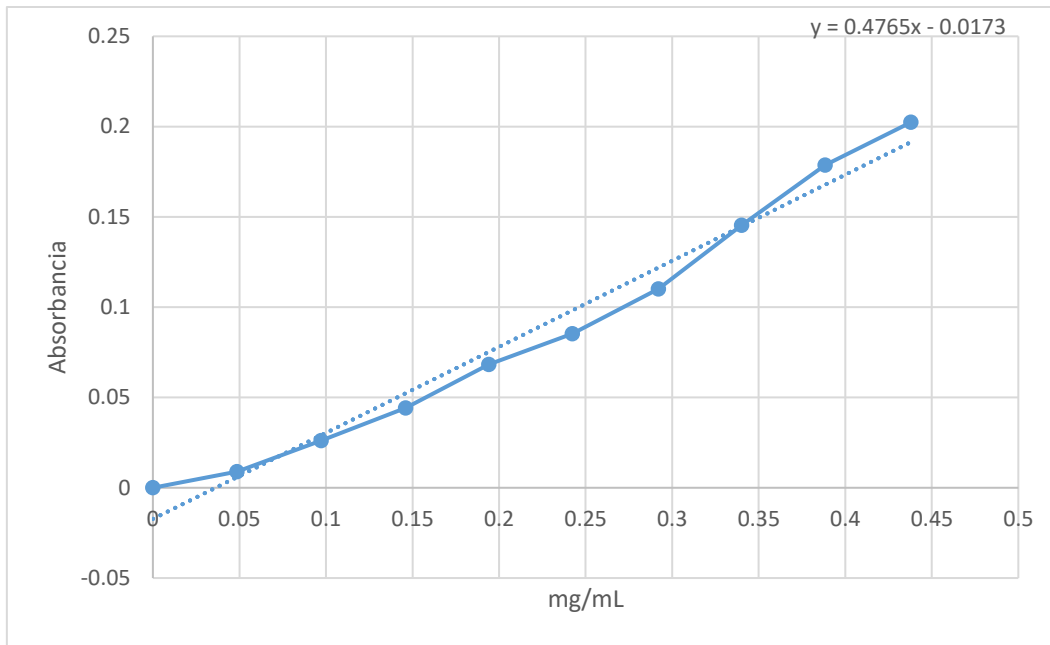


Figura 24. Curva de calibración para la determinación de L-Glutamato.  $R^2=0.98$ .

#### VII.2.6 Liberación de L-Arg y L-Glu en condiciones fisiológicas

En la Figura 25 se muestran las gráficas de la liberación de L-Arg de la HA obtenida a partir de erizo morado y la HA obtenida a partir de  $\text{CaCO}_3$  en fluido fisiológico simulado a  $37^\circ\text{C}$ . Para evaluar si existen diferencias significativas entre las medias de liberación de L-Arg de la HA sintetizada a partir del erizo y la HA sintetizada a partir de  $\text{CaCO}_3$  comercial (N=11), se realizó una prueba de Tukey utilizando Minitab 18 (Tabla 5, Figura 26).

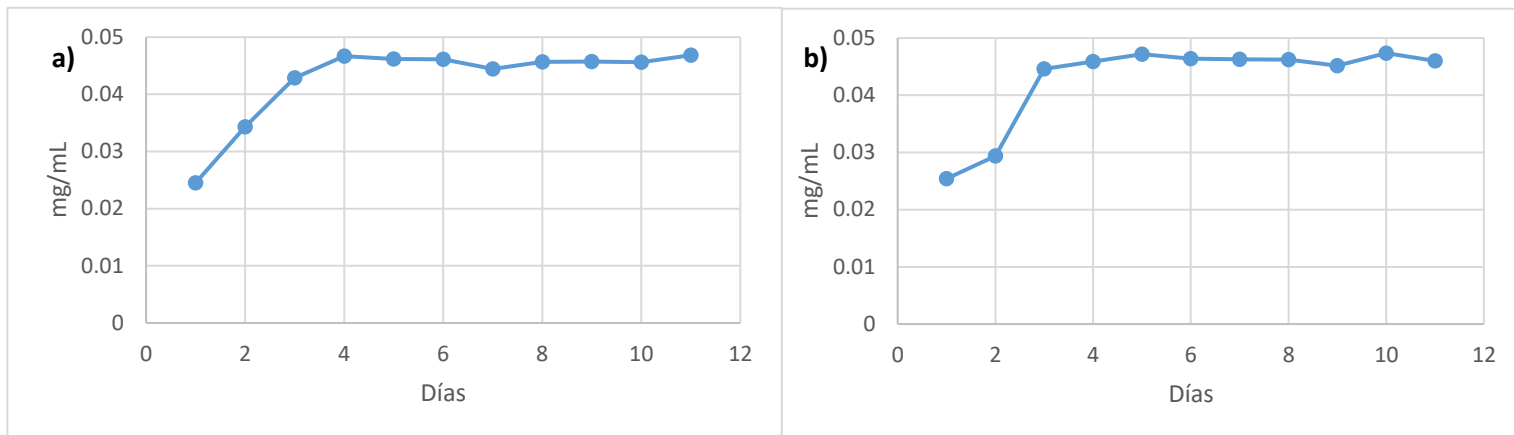


Figura 25. Liberación de L-Arg a lo largo de 11 días en condiciones fisiológicas, comparación entre **a)** HA sintetizada a partir de exoesqueleto de erizo y **b)** HA sintetizada a partir de CaCO<sub>3</sub> comercial

Tabla 5. Prueba de Tukey de la liberación de L- Arg ( $\alpha=95\%$ ) en condiciones fisiológicas (pH7.4, 37°C) y de liberación de L- Arg en pH=5.0.

C1	N	Medias de liberación de a.a. en pH 5 y 7.4	Agrupación
CaCO <sub>3</sub> pH=5	11	0.2390	A
Erizo pH=5	11	0.2228	A
CaCO <sub>3</sub> pH=7.4	11	0.04272	B
Erizo pH=7.4	11	0.04263	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

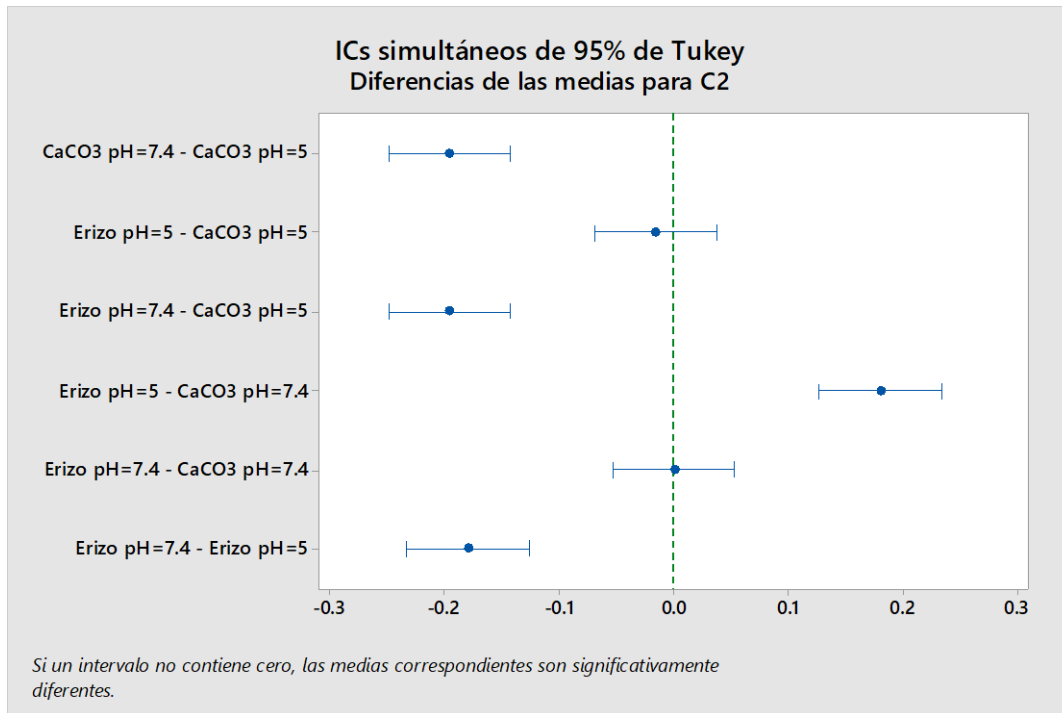


Figura 26. Liberación de L-Arg en condiciones fisiológicas y liberación de L-Arg en pH=5. Diferencias entre las medias de cada HA funcionalizada durante la síntesis (Erizo morado y CaCO<sub>3</sub>,  $\alpha=95\%$ ).

En la Figura 27 se observa la comparación de la liberación de L-Glutamato en fluido fisiológico simulado a 37°C, entre la HA obtenida a partir de erizo morado y la HA obtenida a partir de CaCO<sub>3</sub>. Para evaluar si existen diferencias significativas entre las medias de liberación de L-Glutamato de la HA sintetizada a partir del erizo y la HA sintetizada a partir de CaCO<sub>3</sub> comercial (N=11), se realizó una prueba de Tukey utilizando Minitab 18 (Tabla 6, Figura 28).

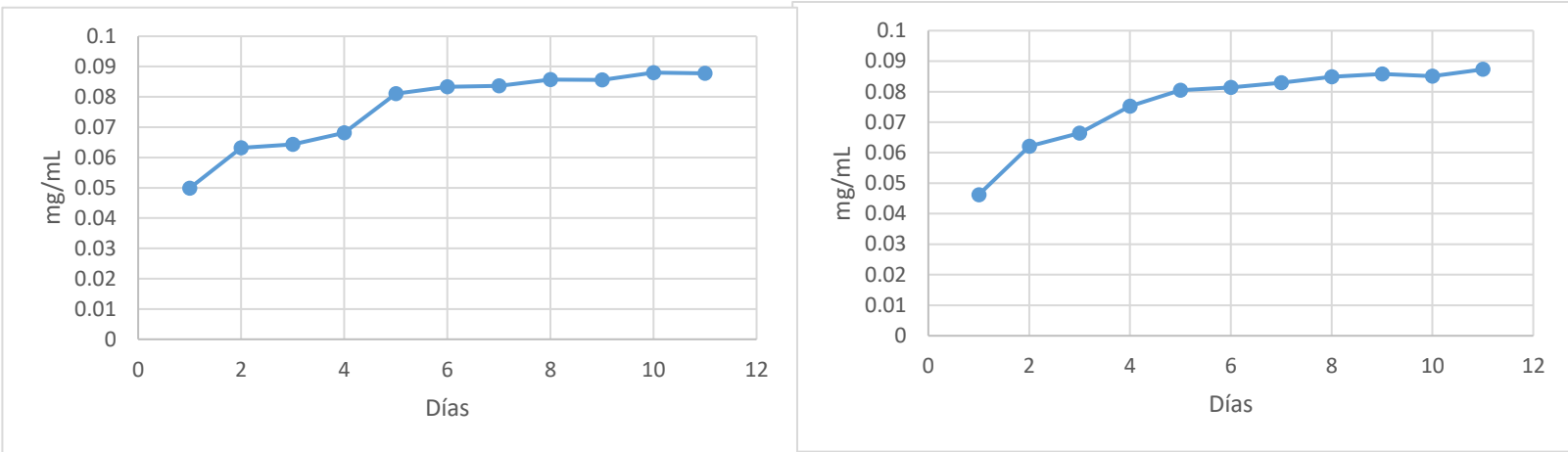


Figura 27. Liberación de L-Glutamato a lo largo de 11 días en condiciones fisiológicas, comparación entre **a)** HA sintetizada a partir de exoesqueleto de erizo y **b)** HA sintetizada a partir de CaCO<sub>3</sub> comercial

Tabla 6. Prueba de Tukey de la liberación de L-Glutamato en condiciones fisiológicas (pH7.4, 37°C) y liberación de L- Arg en pH=5.0 ( $\alpha=95\%$ ).

C1	N	Medias de liberación de a.a.	Agrupación
Erizo-Glu pH5	11	1.341	A
CaCO <sub>3</sub> -Glu pH5	11	1.324	A
Erizo-Glu pH7.4	11	0.07641	B
CaCO <sub>3</sub> -Glu pH7.4	11	0.07617	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

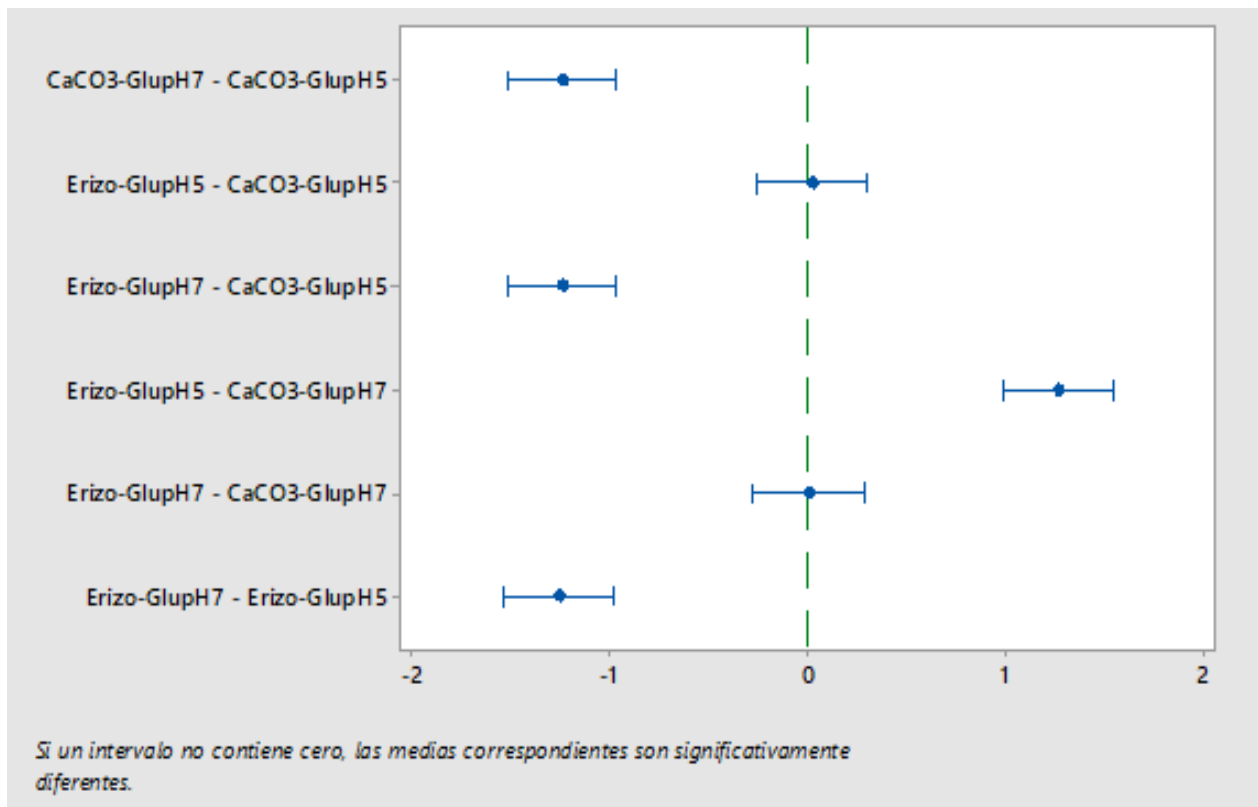


Figura 28. Liberación de L-Glu en condiciones fisiológicas y liberación de L-Glu en pH=5. Diferencias entre las medias de cada HA funcionalizada durante la síntesis (Erizo morado y CaCO<sub>3</sub>,  $\alpha=95\%$ ).

## VII.2.7 Funcionalización con lactoferrina

### VII.2.7.1 Isoterma de Langmuir (HA-Arg-Lf)

El ajuste de los datos (Tabla 7) a la ecuación no lineal de Langmuir se utilizó para construir la isoterma de adsorción (Figura 29).

Tabla 7. Parámetros obtenidos para el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Langmuir, en los que se puede observar  $C_i$ : concentración inicial de adsorbato en solución,  $C_f$ : concentración final de adsorbato en solución,  $q_{max}$ : capacidad máxima de adsorción,  $K_L$ : constante de Langmuir de afinidad,  $Q_e$ : concentración de adsorbato en equilibrio.

$C_i$ mg/L	$C_f$ mg/L	$C_i - C_f$	$Q_e$ mg/g
0	0	0	0
200	172.5386313	27.4613687	5.49227373
400	369.9116998	30.0883002	6.01766004
600	565.8057395	34.1942605	6.8388521
800	763.1346578	36.8653422	7.37306843
1000	961.1479029	38.8520971	7.77041943

$q_{max}$	8.27589091
$K_L$	0.00979034

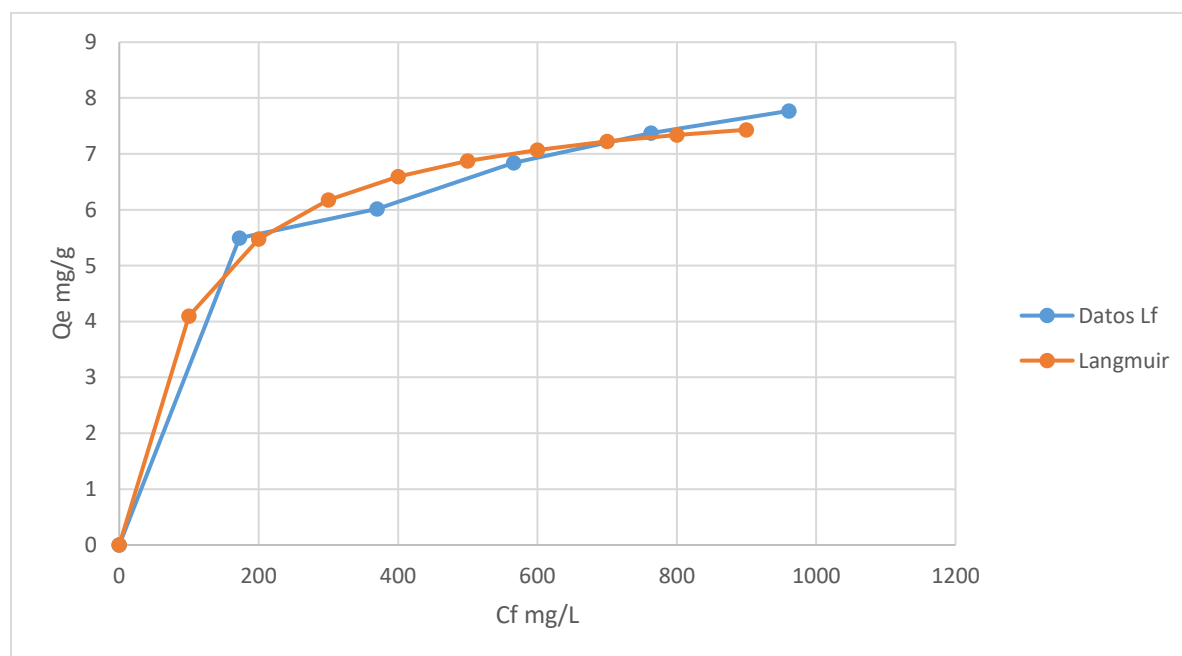


Figura 29. Isoterma de adsorción de Langmuir de Lf a HA-Arg. La línea azul representa los datos obtenidos de la adsorción de Lf, mientras que la línea naranja es el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Langmuir.  $R^2=0.9896$ .

VII.2.7.2 *Isoterma de Langmuir (HA-Glu-Lf)*

El ajuste de los datos (Tabla 8) a la ecuación no lineal de Langmuir se utilizó para construir la isoterma de adsorción (Figura 30).

*Tabla 8. Parámetros obtenidos para el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Langmuir, en los que se puede observar  $C_i$  : concentración inicial de adsorbato en solución,  $C_f$ : concentración final de adsorbato en solución,  $q_{max}$ : capacidad máxima de adsorción,  $K_L$ : constante de Langmuir de afinidad y  $Q_e$ : concentración de adsorbato en equilibrio.*

$C_i$ mg/L	$C_f$ mg/L	$C_i - C_f$	$Q_e$ mg/g
0	0	0	0
200	107.9470199	92.0529801	18.410596
400	298.8741722	101.125828	20.2251656
600	482.9139073	117.086093	23.4172185
800	674.4370861	125.562914	25.1125828
1000	857.3509934	142.649007	28.5298013

$q_{max}$	28.1429871
$K_L$	0.01397297

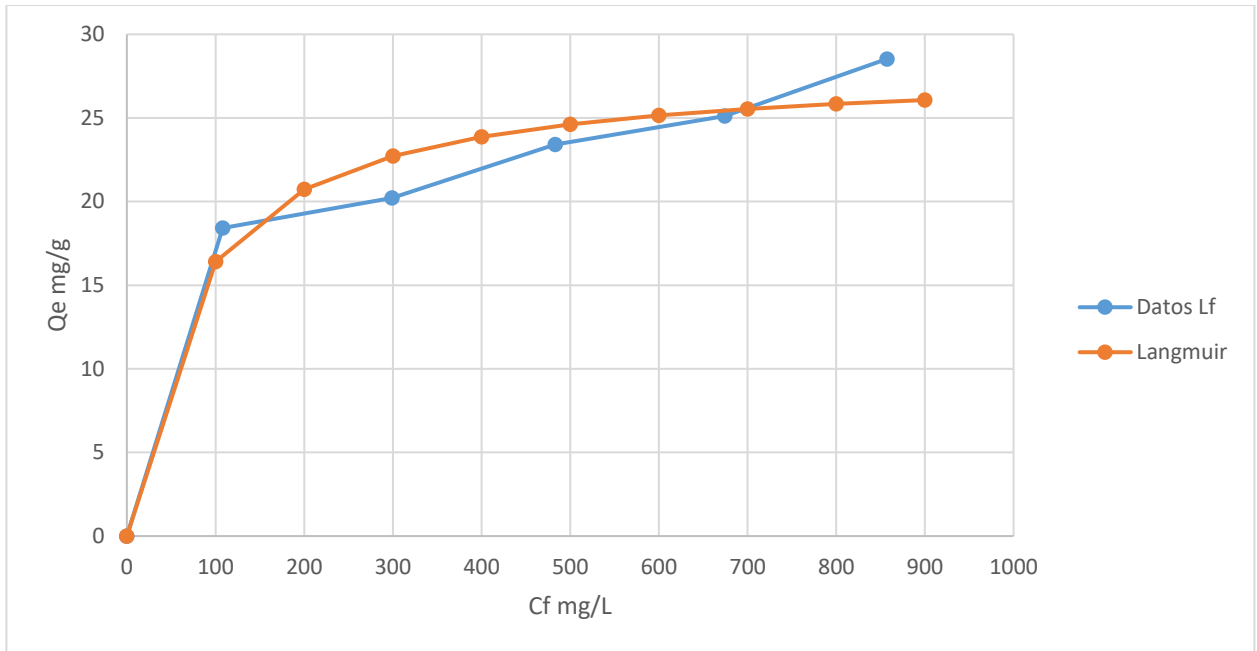


Figura 30. Isoterma de adsorción de Langmuir de Lf a HA-Glu. La línea azul representa los datos obtenidos de la adsorción de Lf, mientras que la línea naranja es el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Freundlich.  $R^2=0.9682$ .

#### VII.2.7.3 Isoterma de Freundlich (HA-Arg-Lf)

El ajuste de los datos (Tabla 9) a la ecuación no lineal de Freundlich se utilizó para construir la isoterma de adsorción (Figura 31).

Tabla 9. Parámetros obtenidos para el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Freundlich, en los que se pueden observar las variables:  $K_f$ : constante de capacidad de adsorción  $C_i$ : concentración inicial de adsorbato en solución,  $C_f$ : concentración final de adsorbato en solución,  $n$ : constante de intensidad de adsorción y  $Q_e$ : concentración de adsorbato en equilibrio.

		1/n	0.21484688
		$K_f$	1.76018042
$C_i$ mg/L	$C_f$ mg/L	$C_i - C_f$	$Q_e$ mg/g
0	0	0	0
200	172.5386313	27.4613687	5.49227373
400	369.9116998	30.0883002	6.01766004
600	565.8057395	34.1942605	6.8388521
800	763.1346578	36.8653422	7.37306843
1000	961.1479029	38.8520971	7.77041943

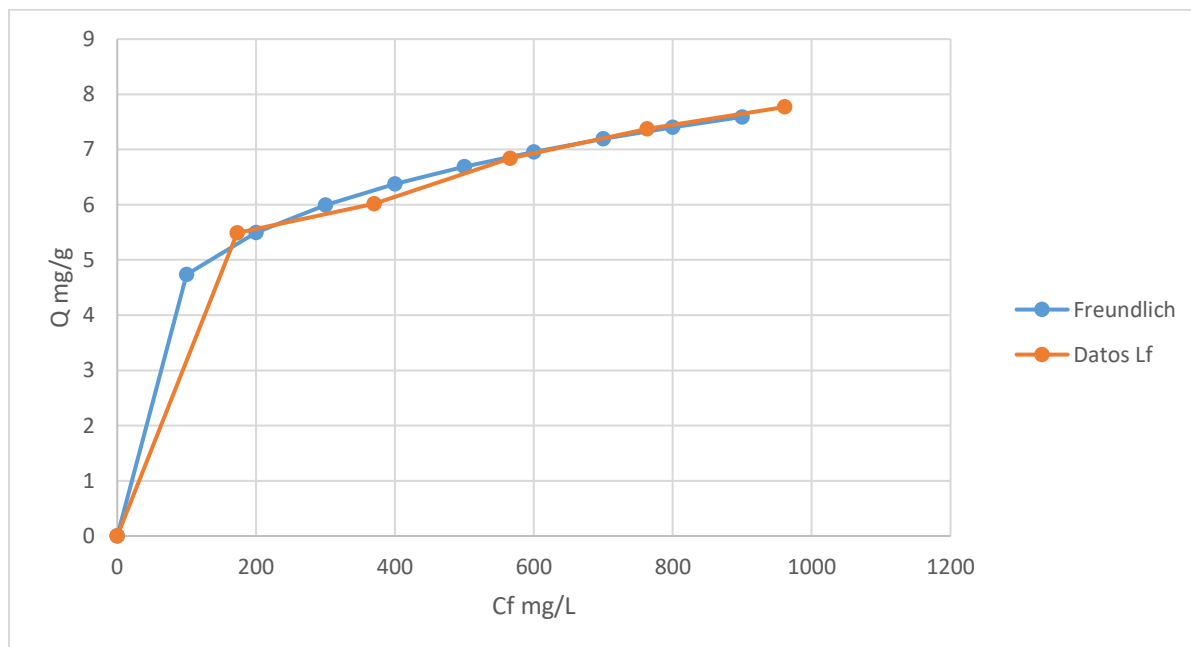


Figura 31. Isotherma de adsorción de Freundlich de Lf a HA-Arg. La línea naranja representa los datos obtenidos de la adsorción de Lf, mientras que la línea azul es el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Freundlich.  $R^2=0.9975$ .

VII.2.7.4 Isoterma de Freundlich (HA-Glu-Lf)

El ajuste de los datos (Tabla 10) a la ecuación no lineal de Freundlich se utilizó para construir la isoterma de adsorción (Figura 32).

Tabla 10. Parámetros obtenidos para el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Freundlich, en los que se pueden observar las variables:  $K_f$ : constante de capacidad de adsorción  $C_i$ : concentración inicial de adsorbato en solución,  $C_f$ : concentración final de adsorbato en solución,  $n$ : constante de intensidad de adsorción y  $Q_e$ : concentración de adsorbato en equilibrio.

		1/n=	0.21860359
		$K_f$	6.20030065
Ci mg/L	Cf mg/L	Ci-Cf	Qe mg/g
0	0	0	0
200	107.9470199	92.0529801	18.410596
400	298.8741722	101.125828	20.2251656
600	482.9139073	117.086093	23.4172185
800	674.4370861	125.562914	25.1125828
1000	857.3509934	142.649007	28.5298013

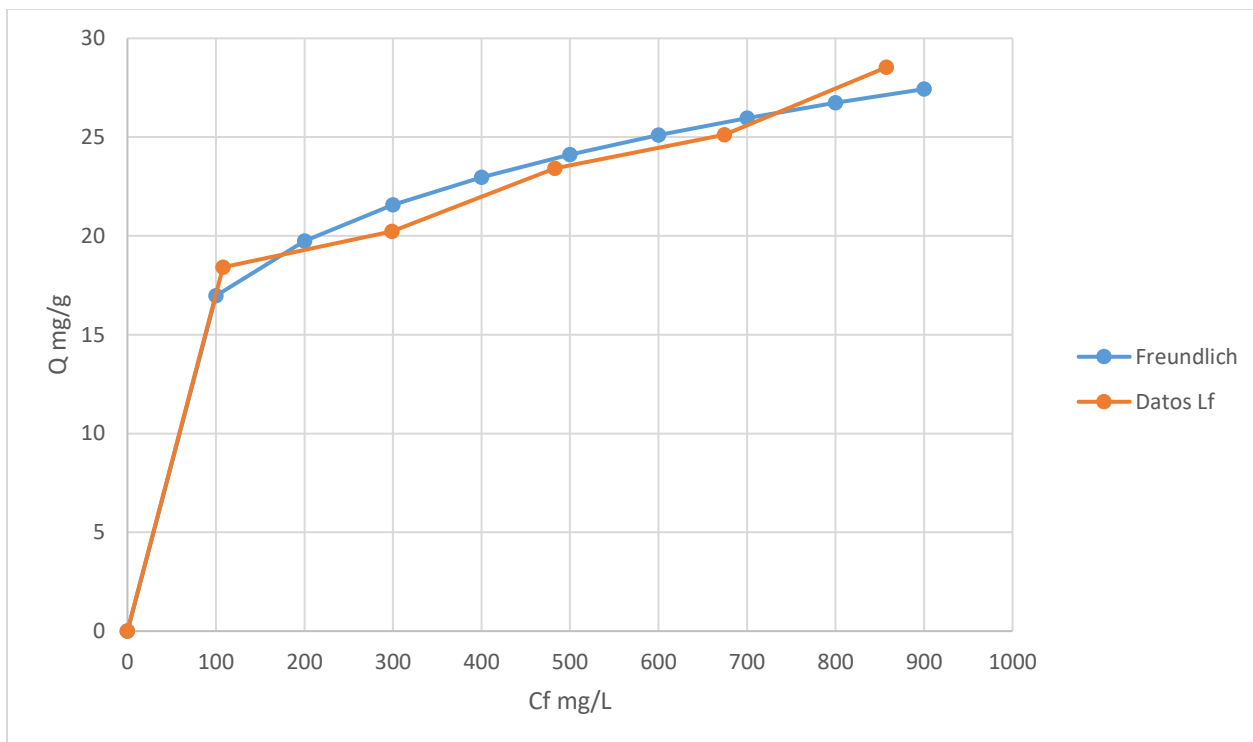


Figura 32. Isoterma de adsorción de Freundlich de Lf a HA-Arg. La línea naranja representa los datos obtenidos de la adsorción de Lf, mientras que la línea azul es el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Freundlich.  $R^2=0.9887$ .

#### VII.2.7.5 Caracterización de grupos funcionales de HA-Arg-Lf

Los espectros FTIR de la funcionalización realizada con lactoferrina muestran los grupos funcionales:  $\text{PO}_4^{3-}$  a 560, 1025.09 y  $\text{OH}^-$  a 630.5  $\text{cm}^{-1}$ . Adicionalmente se pueden apreciar los picos característicos de los compuestos: amida-I a 1654  $\text{cm}^{-1}$ , amida-II  $\text{cm}^{-1}$  a 1540  $\text{cm}^{-1}$  y amida-III a 1240  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 33).

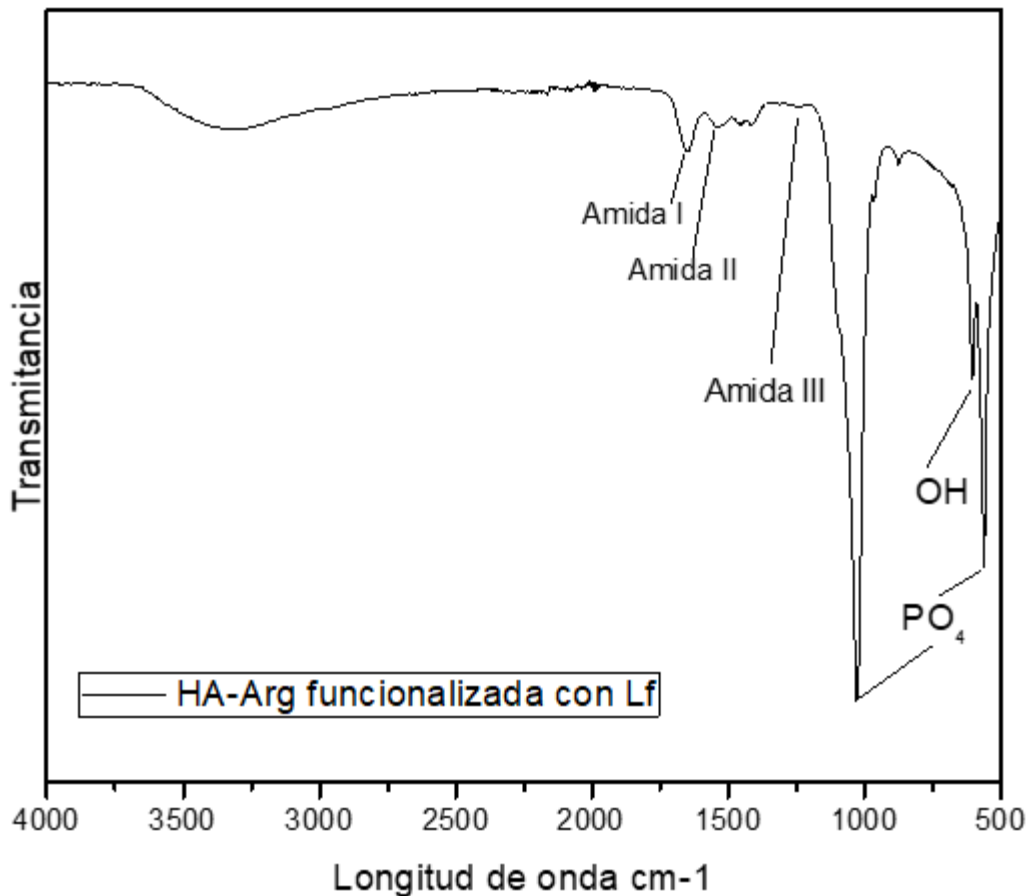


Figura 33. Espectro FTIR de HA-Arg funcionalizada con Lf, en el que se aprecian los picos característicos de los grupos funcionales de la HA así como los picos característicos de las amidas I, II y III.

#### VII.2.7.6 Caracterización de grupos funcionales de HA-Glu-Lf

Los espectros FTIR de la funcionalización realizada con lactoferrina muestran los grupos funcionales:  $\text{PO}_4^{3-}$  a 560, 1025.09 y  $\text{OH}^-$  a 630.5  $\text{cm}^{-1}$ . Adicionalmente se pueden apreciar los picos característicos de los compuestos: amida-I a 1654  $\text{cm}^{-1}$ , amida-II  $\text{cm}^{-1}$  a 1540  $\text{cm}^{-1}$  y amida-III a 1240  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 34).

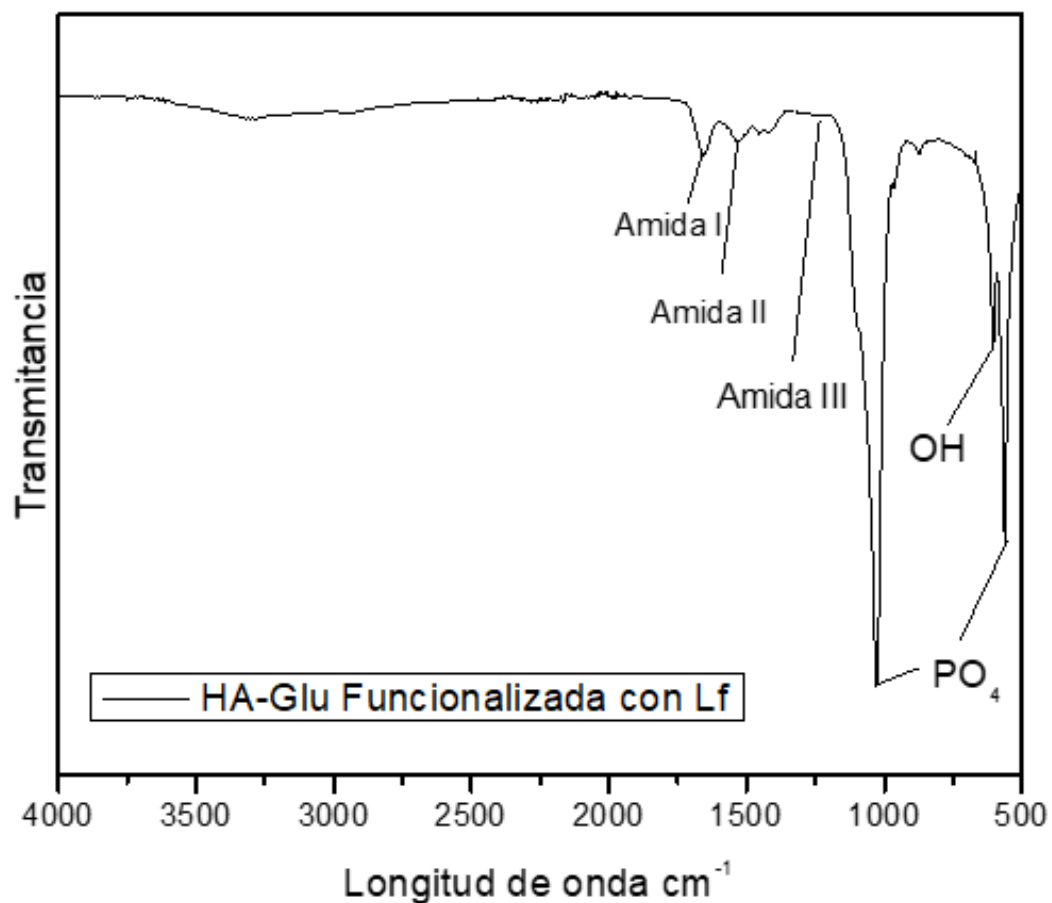


Figura 34. Espectro FTIR de HA-Glu funcionalizada con Lf, en el que se aprecian los picos característicos de los grupos funcionales de la HA así como los picos característicos de las amidas I, II y III.

## VII.2.8 Funcionalización con albúmina

### VII.2.8.1 Isoterma de Langmuir (HA-Arg-BSA)

El ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Langmuir se utilizó para construir la isoterma de adsorción de Langmuir (Figura 35).

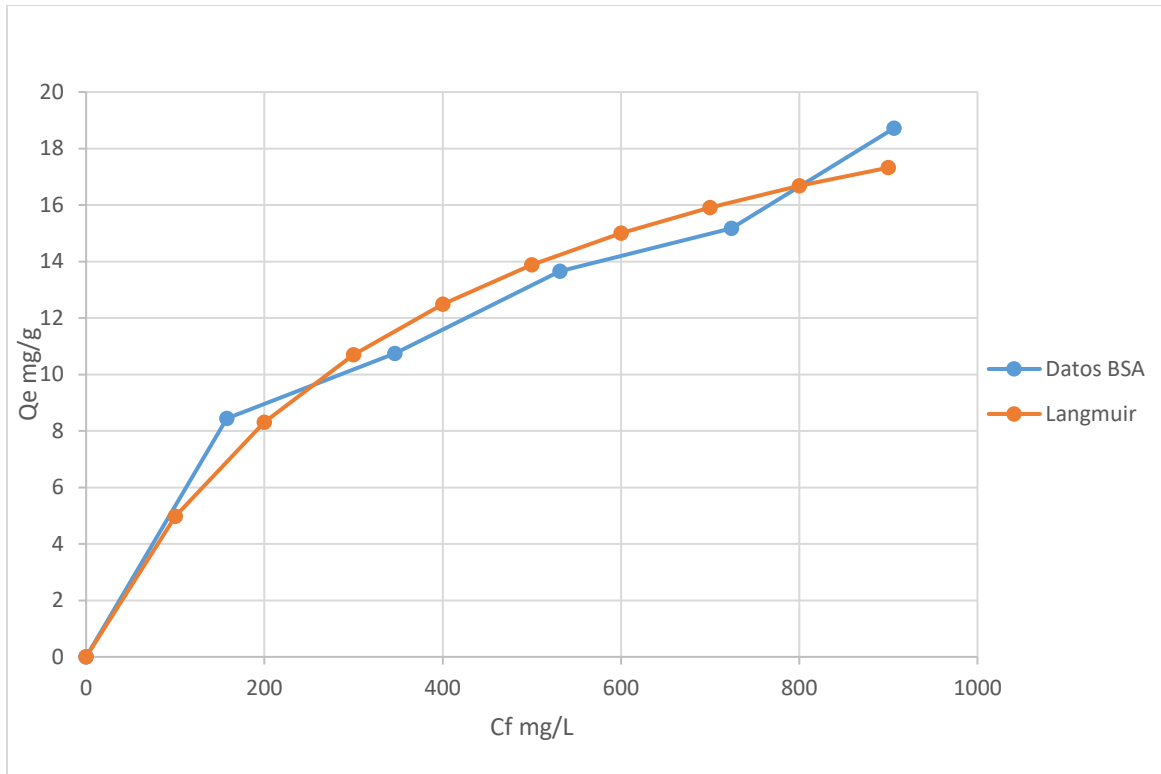


Figura 35. Isotherma de adsorción de Langmuir de BSA a HA-Arg. La línea azul representa los datos obtenidos de la adsorción de BSA, mientras que la línea naranja es el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Langmuir.  $R^2=0.97289$ .

#### VII.2.8.2 Isotherma de Langmuir (HA-Glu-BSA)

El ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Langmuir se utilizó para construir la isoterma de adsorción de Langmuir (Figura 36).

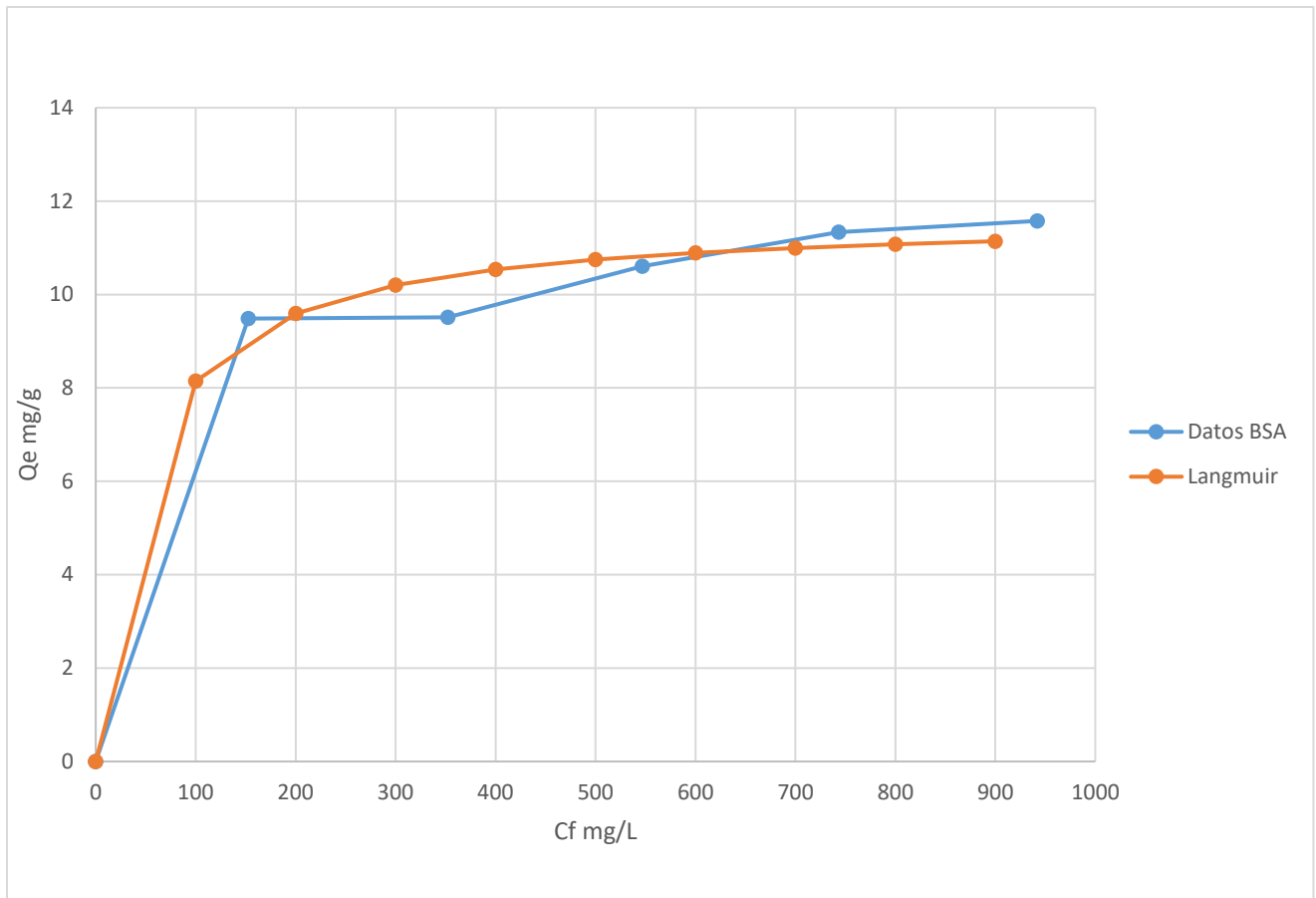


Figura 36. Isoterma de adsorción de Langmuir de BSA a HA-Glu. La línea azul representa los datos obtenidos de la adsorción de BSA, mientras que la línea naranja es el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Langmuir.  $R^2=0.9870$ .

### VII.2.8.3 Isoterma de Freundlich (HA-Arg-BSA)

El ajuste de los datos a la ecuación a la ecuación no lineal de Freundlich se utilizó para construir la isoterma de adsorción de Freundlich (Figura 37).

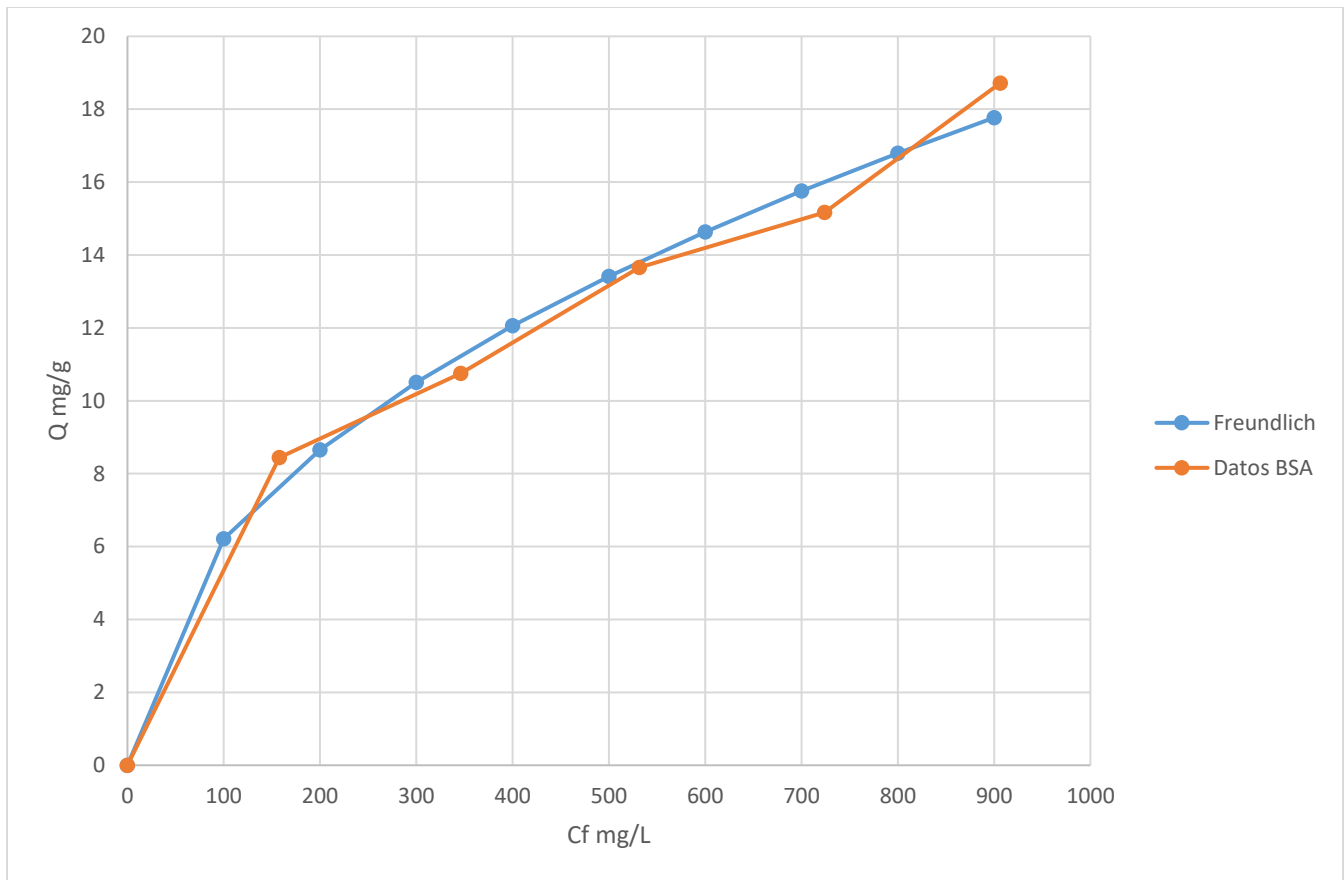


Figura 37. Isoterma de adsorción de Freundlich de BSA a HA-Arg. La línea naranja representa los datos obtenidos de la adsorción de BSA, mientras que la línea azul es el ajuste de los datos a la ecuación no lineal de Freundlich.  $R^2=0.98915$ .

#### VII.2.8.4 Isoterma de Freundlich (HA-Glu-BSA)

El ajuste de los datos a la ecuación a la ecuación no lineal de Freundlich se utilizó para construir la isoterma de adsorción de Freundlich (Figura 38).

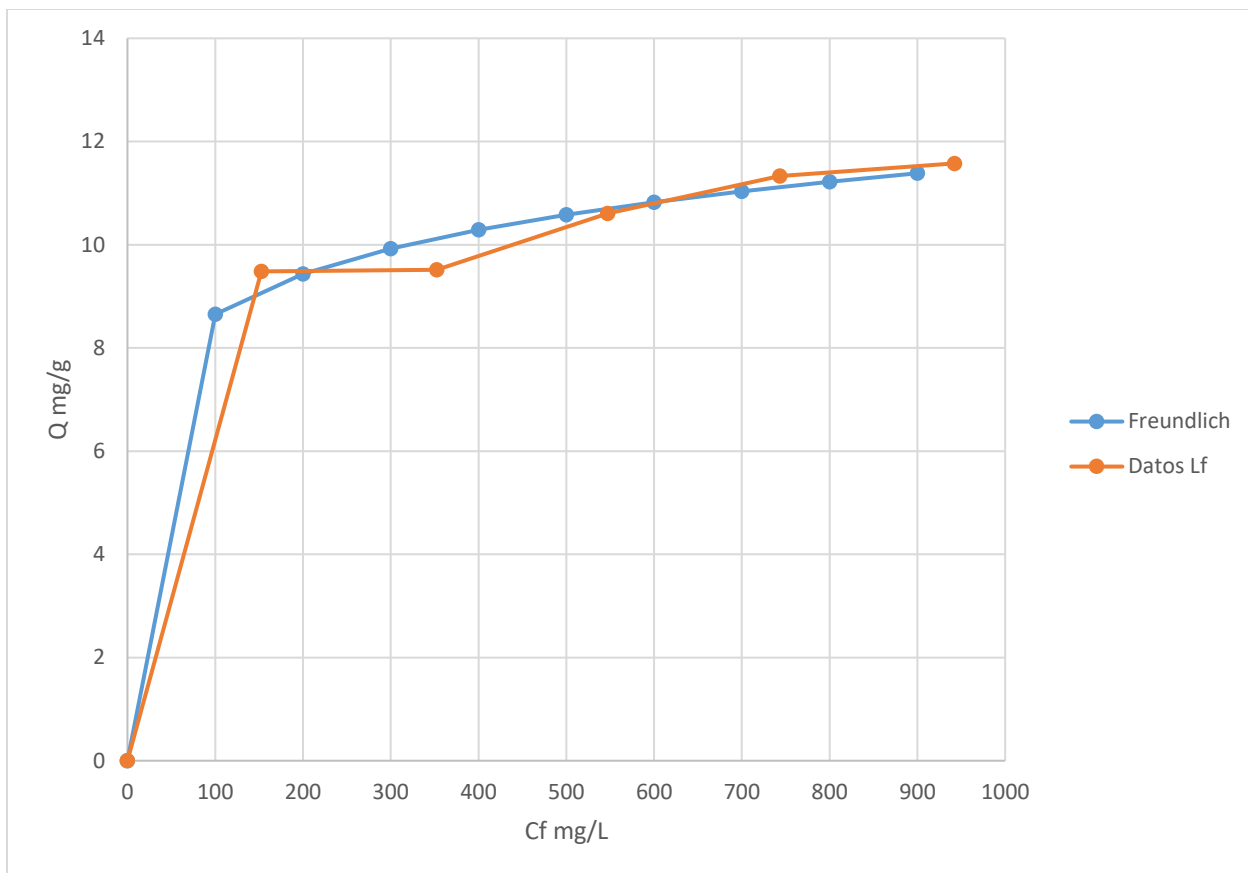


Figura 38. Isoterma de adsorción de Freundlich de BSA a HA-Glu.  $R^2=0.9939$ .

#### VII.2.8.5 Caracterización de grupos funcionales de HA-Arg-BSA

Los espectros FTIR de la funcionalización realizada con albúmina muestran los grupos funcionales:  $\text{PO}_4^{3-}$  a 560, 1025.09 y  $\text{OH}^-$  a  $630.5 \text{ cm}^{-1}$ . Adicionalmente se pueden apreciar los picos característicos de los compuestos: amida-I a  $1656 \text{ cm}^{-1}$ , amida-II a  $1539 \text{ cm}^{-1}$  y amida-III a  $1237 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 39).

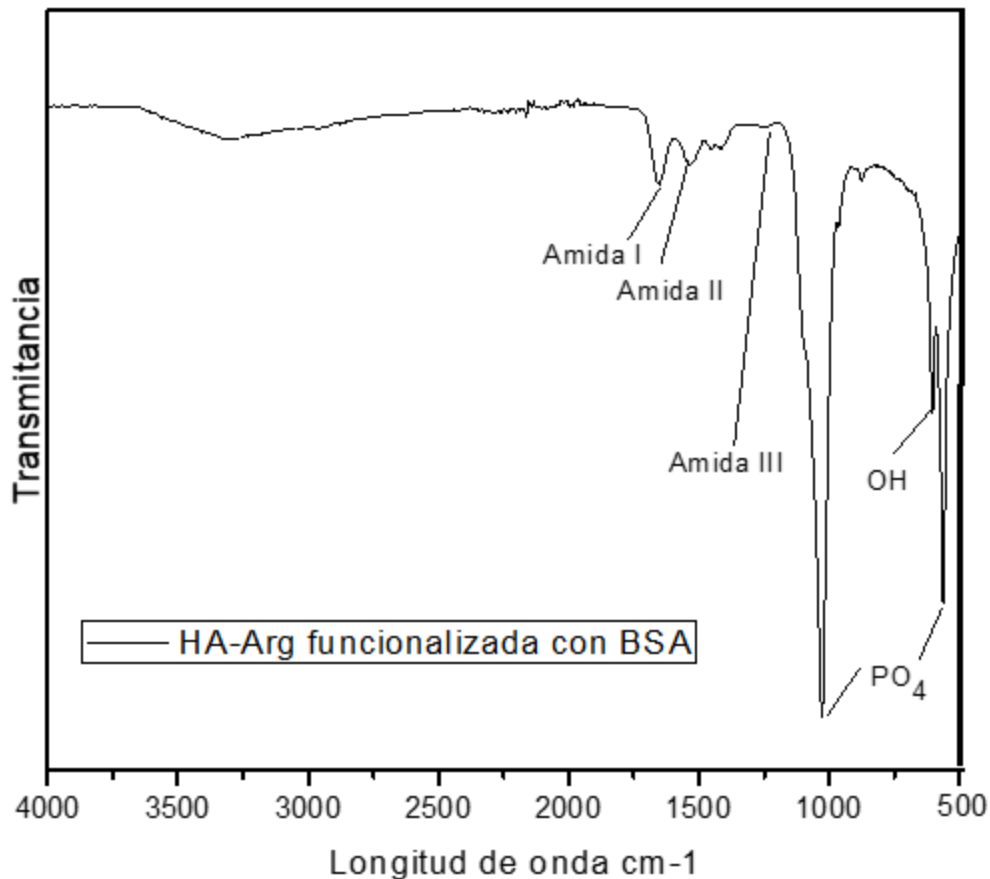


Figura 39. Espectro FTIR de HA-Arg funcionalizada con BSA, en el que se aprecian los picos característicos de los grupos funcionales de la HA así como los picos característicos de las amidas I, II y III.

#### VII.2.8.6 Caracterización de grupos funcionales de HA-Glu-BSA

Los espectros FTIR de la funcionalización realizada con albúmina muestran los grupos funcionales:  $\text{PO}_4^{3-}$  a 560, 1025.09 y  $\text{OH}^-$  a 630.5  $\text{cm}^{-1}$ . Adicionalmente se pueden apreciar los picos característicos de los compuestos: amida-I a 1656  $\text{cm}^{-1}$ , amida-II a 1539  $\text{cm}^{-1}$  y amida-III a 1237  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 40).

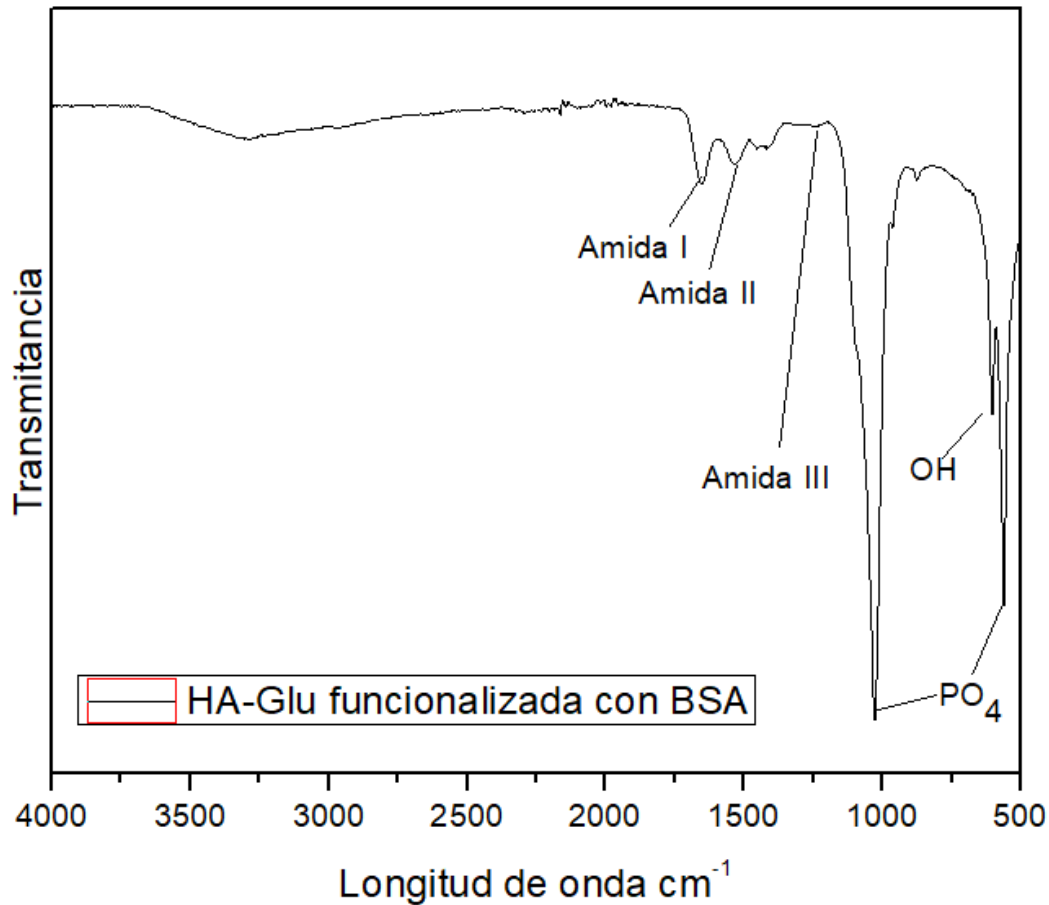


Figura 40. Espectro FTIR de HA-Glu funcionalizada con BSA, en el que se aprecian los picos característicos de los grupos funcionales de la HA así como los picos característicos de las amidas I, II y III.

#### VII.2.8.7 Liberación de BSA y Lf de HA-Arg en condiciones fisiológicas

Los ensayos de liberación de BSA en SBF arrojaron que al transcurrir las primeras 24 horas se liberaron 4.88 mg BSA/g HA, lo cual representa el 26.08% de la cantidad total de BSA adsorbida a HA-Arg (18.71 mg BSA/g HA), mientras que la liberación de Lf, en las mismas 24 horas fue de 6.65 mg Lf/mg HA, lo cual representa un 86.36% de la cantidad total de Lf adsorbida en HA-Arg (7.77 mg Lf/g HA). Al transcurrir los 7 días se

liberó un total de 26.61% de BSA (4.98 mg BSA/g HA) y un 88.18% de Lf (6.79 mg Lf/g HA) (Figura 41).

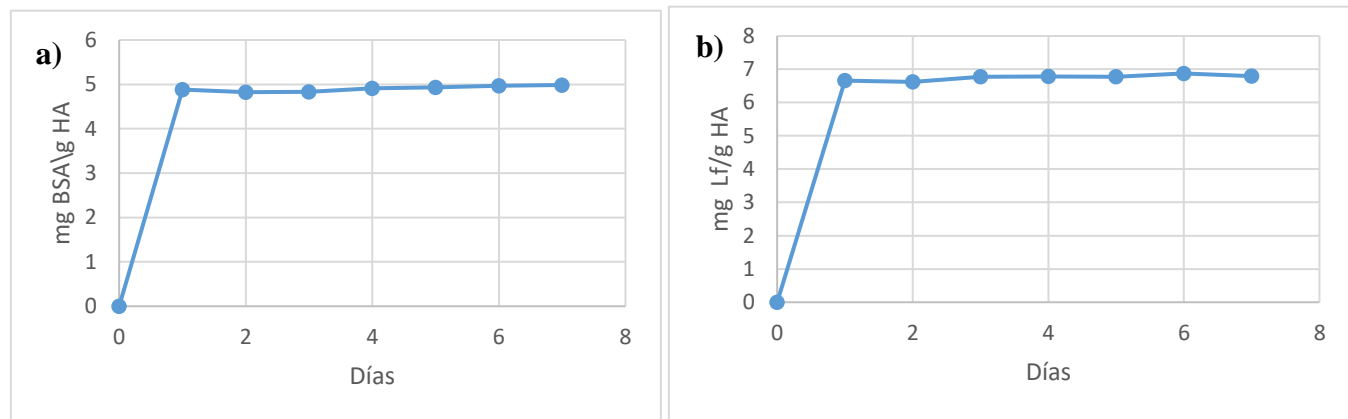


Figura 41. Liberación de BSA (a) y Lf (b) de HA-Arg, en condiciones fisiológicas.

#### VII.2.8.8 Liberación de BSA y Lf de HA-Glu en condiciones fisiológicas

Los ensayos de liberación de BSA en SBF muestran que al transcurrir las primeras 24 horas se liberaron 9.2 mg BSA/g HA, lo cual representa el 79.5% de la cantidad total de BSA adsorbida a HA-Glu (11.57 mg BSA/g HA), mientras que la liberación de Lf en las mismas 24 horas fue de 4.2 mg Lf/mg HA, lo cual representa un 14.73% de la cantidad total de Lf que se adsorbió en HA-Glu (28.5 mg Lf/g HA). Al transcurrir los 7 días se liberó un total de 82.1% de BSA (9.5 mg BSA/g HA) y un 15.08% de Lf (4.3 mg Lf/g HA) (Figura 42).

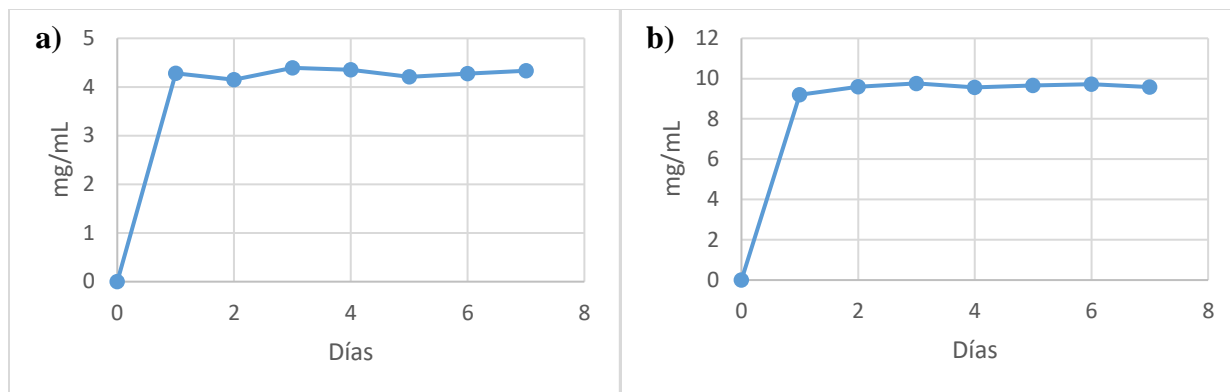


Figura 42. Liberación de BSA (a) y Lf (b) de HA-Glu, en condiciones fisiológicas.

## VIII. Discusión

En el presente trabajo se obtuvieron materiales a base de fosfatos de calcio (entre ellos HA) con diferentes características a partir del exoesqueleto de *Strongylocentrotus purpuratus* utilizando diferentes vías, los resultados que se obtuvieron muestran que la obtención de HA a partir del exoesqueleto de *Strongylocentrotus purpuratus* es posible; sin embargo, se obtuvieron diferentes resultados en relación con las distintas vías por las que se llevó a cabo la reacción.

El método de síntesis seleccionado para los primeros 3 tratamientos es una variación del método utilizado en 2006 para obtener hidroxiapatita a partir de conchas de ostión y  $H_3PO_4$  (H. S. Kim & Ryu, 2006). Las variaciones consistieron en utilizar 3 diferentes tiempos de agitación para evaluar los efectos de esta variable sobre la síntesis, esto teniendo en cuenta que en el proceso de síntesis de un material, el tiempo es una variable muy importante, pues la nucleación y la tasa de crecimiento del cristal determinan la formación de las fases cristalinas. Cada tipo de material tiene una cinética característica de nucleación y crecimiento que depende del tiempo que los reactivos tengan para interactuar entre ellos, si este tiempo no es completado o es excedido, otras

especies cristalinas pueden ser formadas, debido a que las reacciones que les dieron origen no fueron completadas (García, Paucar, Gaviria, & Durán, 2005).

Con el tratamiento 1 no se sintetizó HA, de acuerdo con los análisis realizados, con las condiciones de síntesis que se establecieron, se obtuvo brushita, un biomaterial también de importancia médica, que además de estar involucrado en algunas calcificaciones patológicas, es utilizado en cementos a base de fosfato de calcio en cirugías (S. V. Dorozhkin & Epple, 2002). No obstante, como se aprecia en la Figura 5, la brushita que se sintetizó tiene grupos funcionales  $\text{CO}_3^{2-}$ , cuya presencia no es deseada en biomateriales destinados a interactuar con el sistema óseo. A pesar de que la existencia de impurezas, en especial de  $\text{CO}_3^{2-}$  es un fenómeno que se da de manera natural por un proceso de sustitución en los sitios  $\text{OH}^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  de las apatitas, la presencia de estos grupos tiende a incrementar la solubilidad del biomaterial, factor que promueve la susceptibilidad de los tejidos a desmineralizarse (Pan & Darvell, 2010).

Con el tratamiento 2 al incrementar el tiempo de reacción (18 horas), los grupos  $\text{CO}_3^{2-}$  no deseados disminuyeron y se obtuvo HA a diferencia de los métodos 1 y 3. En este caso, la reacción química para la síntesis de HA a partir de  $\text{CaCO}_3$  no digerido previamente se puede expresar de la siguiente manera:



Con el tiempo de reacción más largo, que corresponde al tratamiento 3 (36 h), con el que se buscó disminuir los grupos  $\text{CO}_3^{2-}$  en la HA, se eliminaron los grupos  $\text{CO}_3^{2-}$ . Sin embargo, los análisis de DRX, muestran otras fases cristalinas no identificadas, pero que

están presentes con mayor predominancia que la HA, esto debido a que el tiempo de reacción excede el necesario para formar HA.

En contraste con el tratamiento 2, en el que si se obtuvo HA pero con grupos  $\text{CO}_3^{2-}$  no deseados, en el caso del tratamiento 4, además de que se obtiene HA en un tiempo de agitación de 3 horas, se eliminaron los grupos funcionales no deseados por completo. Lo anterior gracias a que se realizó una digestión previa de la materia prima en solución ácida ( $\text{HNO}_3$ ), en la cual, los iones  $\text{H}^+$  de la solución ácida reaccionaron con el  $\text{CaCO}_3$ , dando como resultado iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{CO}_2$ , los cationes  $\text{Ca}^{2+}$  a su vez precipitaron en la presencia de aniones ortofosfato para formar fosfato monocálcico monohidratado ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) y dihidrato de fosfato dicálcico ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Además, debido a la reacción con más cationes  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en la solución, el  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  se convierte en  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , el cual se convierte a su vez en fosfato dicálcico anhidro ( $\text{CaHPO}_4$ ) como otro intermediario que finalmente nos da hidroxiapatita al reaccionar con los cationes  $\text{Ca}^{2+}$  restantes, tal como se puede apreciar en la siguiente ruta propuesta previamente (Pham Minh, Lyczko, Sebei, Nzihou, & Sharrock, 2012):

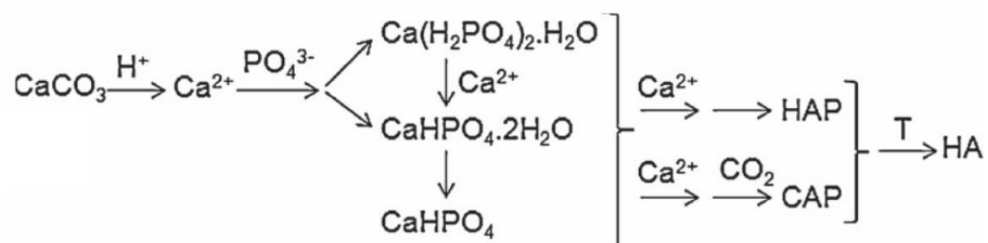


Figura 43. Vía de reacción propuesta para la síntesis de HA a partir de  $\text{CaCO}_3$  en condiciones ácidas (Pham Minh et al., 2012).

Lo anterior nos ayuda a definir que la mejor fuente para producir la HA es a partir del exoesqueleto completo, digiriendo previamente la materia prima, ya que su composición y cristalinidad son importantes para una posible aplicación biomédica (Vagaská et al., 2010) .

Si bien la composición química es importante, las características morfológicas del biomaterial que se obtiene también deben tomarse en cuenta, pues de estas depende el uso que pueda darse al biomaterial. En el presente trabajo, las micrografías SEM muestran el efecto de los diferentes tratamientos (3, 18 y 36 h) y de la digestión con  $\text{HNO}_3$  de la materia prima, en la morfología y tamaño de cristal de las muestras obtenidas a partir del exoesqueleto completo. El material que se obtuvo presenta formas irregulares con un tamaño de partícula diferente en cada uno de los tiempos de reacción estudiados, obteniendo tamaños desde 2 a 10  $\mu\text{m}$  para 3 horas de reacción. Para la muestra a con un tiempo de 18 h, se obtuvieron tamaños de 6  $\mu\text{m}$  y menores, mientras que en la muestra que reaccionó durante 36 h los tamaños de partícula son mayores de 10  $\mu\text{m}$ , para el tratamiento 4 se obtuvieron tamaños de 7  $\mu\text{m}$  y menores. Otros autores que han sintetizado HA a partir de desechos de fuentes marinas como las conchas de algunos moluscos han sintetizado distintos tamaños de partícula utilizando diferentes métodos de síntesis (Tabla 1) . En consecuencia, el tamaño de partícula puede ser un factor a estudiar en futuros trabajos modificando algunas variables como el tiempo de agitación, temperatura o pH para lograr estandarizar la síntesis según los tamaños de partícula que se quieran obtener, por ejemplo, tamaños de partícula en escalas de 60 a 500 nm han sido reportados como promotores de la bioactividad, biocompatibilidad y osteoconductividad (Arsad, Lee, & Lee Kong, 2010).

La relación Ca/P que se obtuvo en las muestras de HA, fue de 1.73 para el tratamiento 2 y 1.68 para el tratamiento 4, y corroboran que los cálculos estequiométricos para la materia prima y  $H_3PO_4$  son correctos (1g de  $CaCO_3$  por cada 0.69 mL de  $H_3PO_4$ ) para obtener un biomaterial biocompatible, pues este debe tener una relación de 1.67 para garantizar una correcta biomineralización del tejido óseo (Abbott & Kaplan, 2016). Los análisis EDS demuestran que el biomaterial que se obtuvo contiene Mg, elemento que puede resultar benéfico para aplicaciones biomédicas, pues es conocido que la presencia de algunos elementos traza como el Mg en las hidroxiapatitas de origen natural son esenciales en la regeneración ósea y aceleran el proceso de biomineralización, ya que se asemejan más a la HA producida por el organismo humano (Mohd Pu'ad et al., 2019).

En cuanto a la funcionalización durante la síntesis, se pueden identificar los picos en FTIR característicos de los grupos funcionales  $NH_2$  y  $C=O$  (W. H. Lee et al., 2015), así como los característicos de la hidroxiapatita, material que fue corroborado mediante DRX (Figura 18), en contraste, con el método de funcionalización post-síntesis, los aminoácidos no se logran fijar en la superficie de la HA como se puede observar en las Figuras 19 y 21, esto debido a que el biomaterial ya está cristalizado y las interacciones electrostáticas entre la superficie de la HA y los a.a. no son lo suficientemente fuertes para mantenerlos inmovilizados en la superficie después de lavar las muestras.

Los aminoácidos utilizados como ligandos para adsorber proteínas a la superficie de la HA fueron L-Arg y L-Glu, ya que han sido reportados como mejoradores de la adsorción de proteínas del medio, así como biomoléculas promotoras de una mayor

adhesión, proliferación y actividad de la enzima fosfatasa alcalina de los osteoblastos (W. H. Lee et al., 2015).

La liberación de L-Arg y L-Glu de las muestras funcionalizadas post-síntesis muestran que tanto para las pruebas de liberación a pH=5 como en condiciones fisiológicas, no hay liberación de aminoácidos. Lo anterior debido a que los aminoácidos no quedan inmovilizados en la superficie de la HA durante la funcionalización post-síntesis de HA. Por consiguiente se demuestra que la mejor manera de funcionalizar el biomaterial es durante la precipitación de la HA (Figuras 19 y 21). Lo anterior es de gran importancia, ya que como ha sido reportado en la literatura, en los casos en los que se pretende algún tipo de interacción electrostática entre biomateriales y proteínas, la inmovilización de biomoléculas con carga en la superficie de los biomateriales resulta ser una estrategia adecuada pues gracias a esto, las proteínas pueden unirse con mayor facilidad, ampliando el rango de proteínas que pueden ser adicionadas a la superficie del biomaterial (W. H. Lee et al., 2014).

En cuanto a la HA funcionalizada durante la síntesis, la liberación de aminoácidos a pH=7 es significativamente menor ( $\alpha = 95\%$ ) que la liberación a pH=5 (Figuras 26 y 28), lo anterior es conveniente para aplicaciones biomédicas pues en condiciones fisiológicas se garantiza la permanencia de los a.a. en la superficie de la HA, y por ende las proteínas adsorbidas a estos, mismas que pueden ser de interés biomédico para favorecer la biomineralización de tejido óseo.

Por otra parte, la determinación de la cantidad de L-Arg adsorbida en la HA funcionalizada mostró que el biomaterial retiene un 6.059% de su peso como L-Arg (60.59 mg L-Arg/ g HA), mientras que la cantidad de L-Glu adsorbida en la HA

funcionalizada fue de 5.26% de su peso (52.61 mg L-Glu/ g HA). La diferencia entre la cantidad de aminoácidos adsorbidos a la superficie de la HA se debe probablemente a las diferencias en las propiedades fisicoquímicas de ambos aminoácidos, pues mientras la L-Arg mantiene una carga positiva tanto en las condiciones de funcionalización como a pH fisiológico, L-Glu está cargado negativamente en estas condiciones. Por otro lado, la L-Arg es el aminoácido con la cadena lateral más larga, mientras que en L-Glu es más corta. Lo anterior repercute en las conformaciones espaciales de cada biomolécula por lo que aunado a las condiciones de síntesis, se tienen diferencias en la cantidad de a.a. adsorbidos a la superficie de la hidroxiapatita.

Los espectros FTIR de la funcionalización con lactoferrina y BSA corroboran la presencia de dichas proteínas en la superficie del biomaterial, tanto para HA-Arg-BSA, HA-Arg-Lf, como para HA-Glu-BSA y HA-Glu-Lf se identificaron los picos característicos de HA en ambos casos.

En cuanto a las proteínas, se identificó el pico característico de la amida I, el cual se encuentra cerca de los  $1650\text{ cm}^{-1}$  y resulta de las vibraciones de tensión del grupo C=O del enlace peptídico; los picos cercanos a  $1540\text{ cm}^{-1}$  y  $1240\text{ cm}^{-1}$  (vibraciones de tensión del grupo C-N y de flexión del grupo N-H) corresponden a la amida II y amida III respectivamente (Dasgupta, Banerjee, Bandyopadhyay, & Bose, 2010; Iafisco, Di Foggia, Bonora, Prat, & Roveri, 2011; Liu, Sun, Yang, Yuan, & Gao, 2015; Skwarek, Janusz, & Sternik, 2017).

Los resultados obtenidos en los experimentos de adsorción de Lf y BSA, se ajustan de mejor manera a la isoterma de Freundlich ( $r^2=0.9975$  para HA-Arg-Lf,  $r^2=0.99407$  para HA-Arg-BSA,  $r^2=0.9887$  para HA-Glu-Lf,  $r^2=0.9939$  para HA-Glu-BSA),

este resultado es esperado, pues la superficie de la HA que se obtuvo en el presente trabajo no es homogénea. Esta isoterma describe los procesos de adsorción de una manera irregular y heterogénea por la naturaleza del material y las moléculas de L-Arg y L-Glu ancladas a su superficie. En contraste, la isoterma de Langmuir considera el proceso de adsorción en monocapa y de manera homogénea (Bolster & Hornberger, 2007; Chen, 2015; W. H. Lee et al., 2013; Piergiovanni, 2014).

En cuanto a la desorción de Lf y BSA de la HA en condiciones fisiológicas, los resultados muestran que el biomaterial funcionalizado se comporta de la manera esperada, ya que el punto isoeléctrico de ambas proteínas (BSA=4.8, Lf=8.7) permite la interacción electrostática entre los aminoácidos y las proteínas utilizadas. En el caso de HA-Arg, esta muestra tiene una mayor afinidad a la BSA y menor a la Lf, pues se desorbió un 88.18% del total de Lf y un 26.66% de BSA de la superficie del biomaterial, mientras que para HA-Glu, la mayor afinidad es a Lf y la menor a BSA, en este caso se obtuvo una desorción mayor de BSA (82.1%), que de Lf (15.08%). Estos resultados, junto con la caracterización de la HA funcionalizada demuestran que funcionalizar la HA con a.a. otorga a la superficie del biomaterial los grupos de unión presentes en ellos ( $\text{COO}^-$  y  $\text{NH}_2^+$ ), mismos que actúan como sitios de unión de las proteínas. En el caso particular del presente trabajo, la lactoferrina tiene una carga positiva en condiciones fisiológicas, mientras que BSA posee carga negativa, por su parte la L-Arg en la superficie de la HA tiene carga positiva y L-Glu negativa, lo cual provoca una desorción mucho mayor de Lf que de BSA en el caso de HA-Arg y viceversa para HA-Glu, estos resultados se asemejan a lo que se obtuvo por Lee y colaboradores en 2013 (W. H. Lee et al., 2013).

Cabe mencionar que en futuros trabajos la desorción de las proteínas se puede aprovechar como una estrategia de liberación dirigida de proteínas o fármacos como claramente marca la tendencia en cuanto a la funcionalización de biomateriales (Abbott & Kaplan, 2016; Haider et al., 2017)

## IX. Conclusiones

El presente trabajo demuestra que la mejor vía de obtención de hidroxiapatita a partir del exoesqueleto de erizo de mar morado *Strongylocentrotus purpuratus* es realizando una digestión de la materia prima con HNO<sub>3</sub> previamente a la síntesis. Además, el biomaterial que se obtuvo incluye elementos traza de origen natural presentes debido a la composición química del exoesqueleto de erizo morado. Esta característica es conveniente evaluarla en futuros ensayos *in vitro* para poder determinar si tiene algún efecto sobre la biomineralización ósea.

Los resultados de adsorción y desorción de las proteínas y aminoácidos de la superficie de la HA corroboran que la estrategia de funcionalización con aminoácidos para ligar proteínas a la superficie de la hidroxiapatita es adecuada. Lo anterior nos permite realizar una iteración rápida y sencilla de las proteínas y/o biomoléculas que se quieran anclar a la superficie de la hidroxiapatita, otorgando una plataforma sencilla para realizar futuros trabajos funcionalizando la superficie del biomaterial con distintas biomoléculas dependiendo el efecto que se quiera lograr.

Los resultados del presente estudio nos permiten evidenciar la capacidad de aprovechar desechos de una industria muy bien establecida como lo es la de los productos marinos y transformarlos en un biomaterial con alto valor biomédico. A su vez la funcionalización de estos biomateriales, se presenta como una de las grandes

perspectivas para obtener una rápida y aumentada regeneración tisular. Los avances de este tipo repercuten directamente en el beneficio de personas que sufren enfermedades del sistema musculo-esquelético.

## X. Referencias

- Abbott, R. D., & Kaplan, D. L. (2016). Engineering Biomaterials for Enhanced Tissue Regeneration. *Current Stem Cell Reports*, 2(2), 140-146. doi: 10.1007/s40778-016-0039-3
- Akram, M., Ahmed, R., Shakir, I., Ibrahim, W. A. W., & Hussain, R. (2013). Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources. *Journal of Materials Science*, 49(4), 1461-1475. doi: 10.1007/s10853-013-7864-x
- Arsad, M. S. M., Lee, P. M., & Lee Kong, H. (2010). Morphology and particle size analysis of hydroxyapatite micro- and nano-particles. *2010 International Conference on Science and Social Research (CSSR 2010)*, 1030-1034. doi: 10.1109/cssr.2010.5773682
- Balázsi, C., Wéber, F., Kövér, Z., Horváth, E., & Németh, C. (2007). Preparation of calcium-phosphate bioceramics from natural resources. *Journal of the European Ceramic Society*, 27(2-3), 1601-1606. doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2006.04.016
- Birla, R. (2014). Biomaterials for Tissue Engineering. *wiley*, 84-129. doi: 10.1002/9781118886410.ch3
- Bolster, C. H., & Hornberger, G. M. (2007). On the Use of Linearized Langmuir Equations. *Soil Science Society of America Journal*, 71(6), 1796. doi: 10.2136/sssaj2006.0304
- Boutinguiza, M., Pou, J., Comesaña, R., Lusquiños, F., de Carlos, A., & León, B. (2012). Biological hydroxyapatite obtained from fish bones. *Materials Science and Engineering: C*, 32(3), 478-486. doi: 10.1016/j.msec.2011.11.021
- Coelho, T. M., Nogueira, E. S., Steimacher, A., Medina, A. N., Weinand, W. R., Lima, W. M., . . . Bento, A. C. (2006). Characterization of natural nanostructured hydroxyapatite obtained from the bones of Brazilian river fish. *Journal of Applied Physics*, 100(9), 094312. doi: 10.1063/1.2369647
- Chen, X. (2015). Modeling of Experimental Adsorption Isotherm Data. *Information*, 6(1), 14-22. doi: 10.3390/info6010014
- Dasgupta, S., Banerjee, S. S., Bandyopadhyay, A., & Bose, S. (2010). Zn- and Mg-doped hydroxyapatite nanoparticles for controlled release of protein. *Langmuir*, 26(7), 4958-4964. doi: 10.1021/la903617e
- Dorozhkin, S. (2013). Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics. *Materials*, 6(9), 3840-3942. doi: 10.3390/ma6093840
- Dorozhkin, S. V., & Epple, M. (2002). Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl*, 41(17), 3130-3146. doi: 10.1002/1521-3773(20020902)41:17<3130::AID-ANIE3130>3.0.CO;2-1
- Dutta, S. R., Passi, D., Singh, P., & Bhuibhar, A. (2015). Ceramic and non-ceramic hydroxyapatite as a bone graft material: a brief review. *Ir J Med Sci*, 184(1), 101-106. doi: 10.1007/s11845-014-1199-8
- García, C. P., Paucar, C., Gaviria, J., & Durán, A. (2005). Effect of Some Physical-Chemical Variables in the Synthesis of Hydroxyapatite by the Precipitation Route. *Key Engineering Materials*, 284-286, 47-50. doi: 10.4028/[www.scientific.net/KEM.284-286.47](http://www.scientific.net/KEM.284-286.47)
- Gunduz, O., Sahin, Y. M., Agathopoulos, S., Ben-Nissan, B., & Oktar, F. N. (2014). A New Method for Fabrication of Nanohydroxyapatite and TCP from the Sea Snail *Cerithium vulgatum*. *Journal of Nanomaterials*, 2014, 1-6. doi: 10.1155/2014/382861
- Haider, A., Haider, S., Han, S. S., & Kang, I.-K. (2017). Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review. *RSC Adv.*, 7(13), 7442-7458. doi: 10.1039/c6ra26124h
- Hench, L. L. (1991). Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, 74(7), 1487-1510. doi: 10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x

- Hennessey, K. M., Clem, W. C., Phipps, M. C., Sawyer, A. A., Shaikh, F. M., & Bellis, S. L. (2008). The effect of RGD peptides on osseointegration of hydroxyapatite biomaterials. *Biomaterials*, 29(21), 3075-3083. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.014
- Hernández, M. R., & Cañas, J. C. (2006). Citotoxicidad in vitro: sistema para la evaluación de biomateriales y equipos médicos implantables en Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*.
- Huang, C., & Cao, P. (2016). Tuning Ca:P ratio by NaOH from monocalcium phosphate monohydrate (MCPM). *Materials Chemistry and Physics*, 181, 159-166. doi: 10.1016/j.matchemphys.2016.06.045
- Iafisco, M., Di Foggia, M., Bonora, S., Prat, M., & Roveri, N. (2011). Adsorption and spectroscopic characterization of lactoferrin on hydroxyapatite nanocrystals. *Dalton Trans*, 40(4), 820-827. doi: 10.1039/c0dt00714e
- Ivankovic, H., Tkalcec, E., Orlic, S., Ferrer, G. G., & Schauerl, Z. (2010). Hydroxyapatite formation from cuttlefish bones: kinetics. *J Mater Sci Mater Med*, 21(10), 2711-2722. doi: 10.1007/s10856-010-4115-4
- Kim, H. S., & Ryu, S. C. (2006). The Characteristic Evaluation of Hydroxyapatite Powders Synthesized from  $\text{CaCO}_3$  Refined from Oyster Shell and  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . *Solid State Phenomena*, 118, 639-644. doi: 10.4028/www.scientific.net/SSP.118.639
- Kim, J. S., & Kim, S. G. (2015). Physico-chemical properties of hydroxyapatite synthesized from the shell of abalone, *Haliotis* sp. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 44, e246-e247. doi: 10.1016/j.ijom.2015.08.190
- Kokubo, T., & Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 27(15), 2907-2915. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017
- Landi, E., Tampieri, A., Mattioli-Belmonte, M., Celotti, G., Sandri, M., Gigante, A., . . . Biagini, G. (2006). Biomimetic Mg- and  $\text{MgCO}_3$ -substituted hydroxyapatites: synthesis characterization and in vitro behaviour. *Journal of the European Ceramic Society*, 26(13), 2593-2601. doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2005.06.040
- 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  $\text{pCO}_2$  during early life stages. *Biogeosciences*, 10(6), 3465-3477. doi: 10.5194/bg-10-3465-2013
- Lee, W.-H., Loo, C.-Y., Zavgorodniy, A. V., Ghadiri, M., & Rohanizadeh, R. (2013). A novel approach to enhance protein adsorption and cell proliferation on hydroxyapatite: citric acid treatment. *RSC Advances*, 3(12), 4040. doi: 10.1039/c3ra22966a
- Lee, W. H., Loo, C. Y., Chrzanowski, W., & Rohanizadeh, R. (2015). Osteoblast response to the surface of amino acid-functionalized hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A*, 103(6), 2150-2160. doi: 10.1002/jbm.a.35353
- Lee, W. H., Loo, C. Y., & Rohanizadeh, R. (2014). A review of chemical surface modification of bioceramics: effects on protein adsorption and cellular response. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 122, 823-834. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.07.029
- Lee, W. H., Loo, C. Y., Van, K. L., Zavgorodniy, A. V., & Rohanizadeh, R. (2012). Modulating protein adsorption onto hydroxyapatite particles using different amino acid treatments. *J R Soc Interface*, 9(70), 918-927. doi: 10.1098/rsif.2011.0586
- Lee, W. H., Loo, C. Y., Zavgorodniy, A. V., & Rohanizadeh, R. (2013). High protein adsorptive capacity of amino acid-functionalized hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A*, 101(3), 873-883. doi: 10.1002/jbm.a.34383
- Liu, F., Sun, C., Yang, W., Yuan, F., & Gao, Y. (2015). Structural characterization and functional evaluation of lactoferrin-polyphenol conjugates formed by free-radical graft copolymerization. *RSC Advances*, 5(20), 15641-15651. doi: 10.1039/c4ra10802g
- Mohd Pu'ad, N. A. S., Koshy, P., Abdullah, H. Z., Idris, M. I., & Lee, T. C. (2019). Syntheses of hydroxyapatite from natural sources. *Heliyon*, 5(5), e01588. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01588
- Monroe, E. A., Votava, W., Bass, D. B., & McMullen, J. (1971). New calcium phosphate ceramic material for bone and tooth implants. *J Dent Res*, 50(4), 860-861. doi: 10.1177/00220345710500041201
- Mucalo, M. (2015). *Hydroxyapatite (HAp) for biomedical applications*: Woodhead Publishing.
- Nelson, M., Balasundaram, G., & Webster, T. J. (2006). Increased osteoblast adhesion on nanoparticulate crystalline hydroxyapatite functionalized with KRSR. *Int J Nanomedicine*, 1(3), 339-349.

- Oh, S., Oh, N., Appleford, M., & Ong, J. L. (2006). Bioceramics for tissue engineering applications—a review. *Am J Biochem Biotechnol*, 2(2), 49-56.
- Ong, J. L., Appleford, M. R., & Mani, G. (2013). *Introduction to biomaterials: basic theory with engineering applications*. United States of America: Cambridge University Press.
- Orlovskii, V. P., Komlev, V. S., & Barinov, S. M. (2002). Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics. *Inorganic Materials*, 38(10), 973-984. doi: 10.1023/a:1020585800572
- Pan, H., & Darvell, B. W. (2010). Effect of Carbonate on Hydroxyapatite Solubility. *Crystal Growth & Design*, 10(2), 845-850. doi: 10.1021/cg901199h
- Park, J. (2009). Bioceramics. *springer*. doi: 10.1007/978-0-387-09545-5
- Patel, N. R., & Gohil, P. P. (2012). A review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 2(4).
- Pepla, E., Besharat, L. K., Palaia, G., Tenore, G., & Migliau, G. (2014). Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. *Ann Stomatol (Roma)*, 5(3), 108-114.
- Pham Minh, D., Lyczko, N., Sebei, H., Nzihou, A., & Sharrock, P. (2012). Synthesis of calcium hydroxyapatite from calcium carbonate and different orthophosphate sources: A comparative study. *Materials Science and Engineering: B*, 177(13), 1080-1089. doi: 10.1016/j.mseb.2012.05.007
- Piergiovanni, P. R. (2014). Adsorption Kinetics and Isotherms: A Safe, Simple, and Inexpensive Experiment for Three Levels of Students. *Journal of Chemical Education*, 91(4), 560-565. doi: 10.1021/ed400267j
- Polini, A., Wang, J., Bai, H., Zhu, Y., Tomsia, A. P., & Mao, C. (2014). Stable biofunctionalization of hydroxyapatite (HA) surfaces by HA-binding/osteogenic modular peptides for inducing osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomater Sci*, 2(12), 1779-1786. doi: 10.1039/C4BM00164H
- Qu, Z., Yan, J., Li, B., Zhuang, J., & Huang, Y. (2010). Improving bone marrow stromal cell attachment on chitosan/hydroxyapatite scaffolds by an immobilized RGD peptide. *Biomed Mater*, 5(6), 065001. doi: 10.1088/1748-6041/5/6/065001
- Reyes-Gasga, J., Martinez-Pineiro, E. L., Rodriguez-Alvarez, G., Tiznado-Orozco, G. E., Garcia-Garcia, R., & Bres, E. F. (2013). XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 33(8), 4568-4574. doi: 10.1016/j.msec.2013.07.014
- Rivera, E. M., Araiza, M., Brostow, W., Castaño, V. M., Díaz-Estrada, J. R., Hernández, R., & Rodríguez, J. R. (1999). Synthesis of hydroxyapatite from eggshells. *Materials Letters*, 41(3), 128-134. doi: 10.1016/s0167-577x(99)00118-4
- Sequeda, L., Díaz, J., Gutiérrez, S., Perdomo, S., & Gómez, O. (2012). Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 41(1), 50-66.
- Skwarek, E., Janusz, W., & Sternik, D. (2017). The influence of the hydroxyapatite synthesis method on the electrochemical, surface and adsorption properties of hydroxyapatite. *Adsorption Science & Technology*, 35(5-6), 507-518. doi: 10.1177/0263617417698966
- Sopyan, I., Mel, M., Ramesh, S., & Khalid, K. A. (2007). Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 8(1-2), 116-123. doi: 10.1016/j.stam.2006.11.017
- Thamaraiselvi, T., & Rajeswari, S. (2004). Biological evaluation of bioceramic materials—a review. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 18(1), 9-17.
- Treccani, L., Yvonne Klein, T., Meder, F., Pardun, K., & Rezwani, K. (2013). Functionalized ceramics for biomedical, biotechnological and environmental applications. *Acta Biomater*, 9(7), 7115-7150. doi: 10.1016/j.actbio.2013.03.036
- Vagaská, B., Bacáková, L., Filová, E., & Balík, K. (2010). Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. *Physiological research*, 59(3), 309-322.
- Vallet-Regí, M., & Ruiz-Hernandez, E. (2011). Bioceramics: from bone regeneration to cancer nanomedicine. *Adv Mater*, 23(44), 5177-5218. doi: 10.1002/adma.201101586
- Venkatesan, J., & Kim, S. K. (2014). Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering—a review. *J Biomed Nanotechnol*, 10(10), 3124-3140. doi: 10.1166/jbn.2014.1893

- Venkatesan, J., Qian, Z., Ryu, B., Thomas, N., & Kim, S. (2011). A comparative study of thermal calcination and an alkaline hydrolysis method in the isolation of hydroxyapatite from *Thunnus obesus* bone. *Biomedical Materials*, 6(3), 35003. doi: 10.1088/1748-6041/6/3/035003
- Wang, C., Liu, Y., Fan, Y., & Li, X. (2017). The use of bioactive peptides to modify materials for bone tissue repair. *Regen Biomater*, 4(3), 191-206. doi: 10.1093/rb/rbx011
- Wang, M.-C., Shih, W.-J., Hung, I. M., Chen, H.-T., Hon, M.-H., & Huang, H.-H. (2015). Characterization of calcium phosphate apatite with variable Ca/P ratios sintered at low temperature. *Ceramics International*, 41(1), 1223-1233. doi: 10.1016/j.ceramint.2014.09.051
- Zurlinden, K., Laub, M., & Jennissen, H. P. (2005). Chemical Functionalization of a Hydroxyapatite Based Bone Replacement Material for the Immobilization of Proteins. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 36(12), 820-827. doi: 10.1002/mawe.200500978