

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



**HIDROXIAPATITA IMPURIFICADA CON DISPROSIO COMO
UNA PLATAFORMA IDEAL PARA EL DESARROLLO DE
TERANÓSTICOS.**

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE

BIOINGENIERO

PRESENTA

SERGIO CASTRO ARANDA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO, JUNIO DE 2013.

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

**HIDROXIAPATITA IMPURIFICADA CON DISPROSIO COMO UNA
PLATAFORMA IDEAL PARA EL DESARROLLO DE TERANÓSTICOS.**

TESIS
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE

BIOINGENIERO

PRESENTA

SERGIO CASTRO ARANDA

Aprobada por:



Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores
Director del Comité



M.C. David Cervantes Vásquez
Miembro del Comité



Dra. Graciela Guerra Rivas
Miembro del Comité

RESUMEN

De la tesis de **Sergio Castro Aranda**, presentada como requisito parcial para la obtención del título de **BIOINGENIERO**. Ensenada, Baja California. Junio de 2013.

HIDROXIAPATITA IMPURIFICADA CON DISPROSIO COMO UNA PLATAFORMA IDEAL PARA EL DESARROLLO DE TERANÓSTICOS.

Resumen aprobado por:



Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores
Director de Tesis

En este trabajo se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas luminiscentes de hidroxiapatita impurificada con disprosio ($\text{Ca}_{10-x}\text{Dy}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-x}\text{O}_x\text{:HAp:Dy}^{3+}$) utilizando diferentes concentraciones de Dy^{3+} mediante el método sol-gel asistido con ácido tartárico. Se obtuvieron dos series de los materiales mencionados. La primera serie fue sometida a un tratamiento térmico de 800 °C y la segunda a 1000 °C. Posteriormente, se analizó el comportamiento de las propiedades fluorescentes de las nanopartículas de HAp:Dy^{3+} inmersas en agua con diferentes valores de pH, en orina y en suero humano. Finalmente, las nanopartículas fueron funcionalizadas con albúmina sérica bovina ($\text{HAp:Dy}^{3+}\text{@BSA}$). Los espectros de excitación y emisión de las nanopartículas de HAp:Dy^{3+} fueron analizadas por fotoluminiscencia. La estructura cristalina y la composición del material se determinaron por difracción de rayos X y espectroscopía de dispersión de energía. La morfología y el tamaño de partícula se determinaron por microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido. Las propiedades fotoluminiscentes y el comportamiento de la HAp:Dy^{3+} inmersa en diferentes fluidos se obtuvieron por fotoluminiscencia. Finalmente, los análisis de la funcionalización de la $\text{HAp:Dy}^{3+}\text{@BSA}$ se realizaron por espectroscopía infrarroja y fotoluminiscencia. Los resultados de fotoluminiscencia mostraron cuatro picos de emisión correspondientes a las transiciones típicas del Dy^{3+} a 485, 575, 660 y 755 nm correspondientes a las transiciones ${}^4\text{F}_{9/2}\rightarrow{}^6\text{H}_{15/2}$, ${}^4\text{F}_{9/2}\rightarrow{}^6\text{H}_{13/2}$, ${}^4\text{F}_{9/2}\rightarrow{}^7\text{H}_{11/2}$ y ${}^4\text{F}_{9/2}\rightarrow{}^7\text{H}_{9/2}$, respectivamente. La transición ${}^4\text{F}_{9/2}\rightarrow{}^6\text{H}_{13/2}$ centrada en los 575 nm fue la que presentó mayor intensidad. Las nanopartículas de HAp:Dy^{3+} preservaron sus propiedades luminiscentes después de haber sido dispersadas en los diferentes fluidos. Finalmente, los resultados de espectroscopía infrarroja mostraron que las nanopartículas fueron exitosamente funcionalizadas con albúmina sérica bovina. De acuerdo con los resultados obtenidos, las nanopartículas de HAp:Dy^{3+} podrían funcionar como una plataforma ideal para el desarrollo de teranósticos.

Palabras Clave: Hidroxiapatita, disprosio, fluorescencia, sol-gel, teranóstico.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores.

M.C. David Cervantes Vásquez.

Dra. Mariana Jeannete Oviedo Bandera.

Dra. Graciela Guerra Rivas.

Blanca Angélica García García.

Karen Medina Bravo.

M.C. Eloísa Aparicio Ceja.

Ing. Israel Gradilla Mtz.

Ing. Francisco Ruiz.

Biól. María Isabel Pérez Montfort.

CONACYT CB-2008/100555.

DGAPA UNAM IN114010, IN109612.

CONTENIDO

RESUMEN	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	x
I. Introducción.....	1
Hipótesis y objetivos	8
Hipótesis.....	8
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos.....	8
II. Marco teórico	10
II.1 El espectro electromagnético	10
II.2 Luminiscencia	13
II.2.1 Teoría de la fotoluminiscencia.....	14
II.2.1.1 Fluorescencia.....	16
II.2.2 Materiales fluorescentes.....	19
II.2.3 Iones lantánidos.....	20
II.3 Disproso	22
II.3.1 Propiedades fotoluminiscentes del disproso	22
II.3.2 Aplicaciones.....	24
II.4 Hidroxiapatita.....	25
II.4.1 Estructura de la hidroxiapatita	26
II.4.2 Propiedades de la hidroxiapatita	30
II.4.3 Aplicaciones de la hidroxiapatita.....	30
II.4.4 Hidroxiapatita impurificada con disproso como una plataforma ideal para el desarrollo de teranósticos.....	31
II.5 Fluidos corporales.....	33
II.5.1 Agua	33
II.5.2 Orina.....	35
II.5.3 Suero	36
II.6 Proteínas	38
II.6.1 Albúmina sérica	41

CONTENIDO (continuación)

III. Técnicas experimentales	43
III.1 Sol-gel	43
III.2 Difracción de rayos X	45
III.3 Microscopía electrónica de transmisión.....	48
III.4 Microscopía electrónica de barrido.....	50
III.5 Espectroscopía de dispersión de energía.....	51
III.6 Espectroscopía de fotoluminiscencia.....	53
III.7 Espectroscopía infrarroja.....	55
III.8 Funcionalización de nanopartículas con proteínas	58
IV. Materiales y método	63
IV.1 Reactivos y materiales.....	63
IV.2 Síntesis de HAp:Dy³⁺	63
IV.3 Estudio del comportamiento de la fluorescencia de la HAp:Dy³⁺ en fluidos....	65
IV.4 Pruebas de estabilidad de fluorescencia de la HAp:Dy³⁺ en agua bajo diferentes valores de pH.....	66
IV.5 Funcionalización de HAp:Dy³⁺ con BSA.....	67
IV.6 Caracterización.....	69
V. Resultados y discusión	70
V.1 Difracción de rayos X	70
V.2 Microscopía electrónica de barrido.....	73
V.3 Espectroscopía de dispersión de energía	74
V.4 Microscopía electrónica de transmisión	75
V.5 Fotoluminiscencia	78
V.6 Fotoluminiscencia: pruebas de estabilidad y comportamiento en fluidos.....	87
V.6.1 Fotoluminiscencia de HAp:Dy ³⁺ en agua	87
V.6.2 Fotoluminiscencia de HAp:Dy ³⁺ en orina.....	90
V.6.3 Fotoluminiscencia de HAp:Dy ³⁺ en suero sanguíneo	92
V.7 Espectroscopía infrarroja de la funcionalización de HAp:Dy³⁺@BSA	94
V.8 Fotoluminiscencia de la funcionalización de HAp:Dy ³⁺ @BSA.....	96
V.9 Resumen.....	97

CONTENIDO (continuación)

Conclusiones	101
Referencias	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de escalas de los nanomateriales (Castro, 2012).....	5
Figura 2. Oscilación de una onda electromagnética (Rodríguez y Sánchez, 2005).....	10
Figura 3. Relación de la frecuencia y la longitud de onda. Las frecuencias bajas tienen longitudes de onda largas (a) y las frecuencias altas tienen longitudes de onda cortas (b) (Burns, 2003).	11
Figura 4. El espectro electromagnético (Peña, 2004).	12
Figura 5. Estados electrónicos del espín de un átomo (Skoog et al., 2008).	15
Figura 6. Espectros de excitación (línea continua) y emisión (línea punteada) de una molécula típica fluorescente y su desplazamiento de Stokes (Freifelder, 2003).	16
Figura 7. Diagrama de los niveles de energía de un sistema fluorescente (Skoog et al., 2008).	18
Figura 8. Proceso de fluorescencia de una red cristalina que hospeda a un ión activador. ..	19
Figura 9. Los niveles de energía del Dy^{3+} y sus transiciones de emisión (Shinde et al., 2011).	23
Figura 10. Espectro de emisión del fósforo $\beta-Ca_3(PO_4)_2:Dy$. $\lambda_{ex}= 350$ nm (Nakashima et al., 2005).	24
Figura 11. Celda unitaria de la hidroxiapatita. Mostrando los átomos de calcio tipo I (Ca(I)) y los de calcio tipo II (Ca(II)) en color azul, los átomos de fósforo rodeados por cuatro átomos de oxígeno (color rojo) formando el tetraedro representativo del grupo fosfato en color morado claro y los grupos hidroxilo en color verde (Pavan et al., 2012).....	28
Figura 12. Cuatro celdas unitarias adyacentes representado la estructura hexagonal de la hidroxiapatita a lo largo del eje c. Ca^{2+} = azul, OH^- = verde, O = rojo, PO_4^{3-} = morado (Pavan et al., 2012).	29
Figura 13. Cuatro moléculas de agua ordenadas en el espacio en forma de tetraedro y unidas entre sí por puentes de hidrógeno (señalados con puntos) (Teijón y Garrido, 2006).	34
Figura 14. Estructura general de los aminoácidos (Voet et al., 2007).	39
Figura 15. Ensamble de dos aminoácidos mediante el enlace peptídico (Alberts et al., 2006).	39
Figura 16. Estructuras conformacionales de las proteínas (Witherly, 2012).	40
Figura 17. Esquema de la disposición en bucles de la albúmina y principales sitios de unión de los ligandos (Teijón y Garrido, 2006).	42

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura 18. Esquema general del proceso sol-gel y su versatilidad de técnicas para la obtención de materiales. Se resalta en verde la ruta utilizada en esta investigación (Brinker y Scherer, 1990).....	43
Figura 19. Ión disprosio atrapado por un par de moléculas de ácido tartárico. Los iones lantánidos trivalentes tienden a formar complejos estables con los ácidos hidroxicarboxílicos.	44
Figura 20. Representación esquemática bidimensional de (a) un sólido cristalino y (b) un sólido amorfo (Shriver, Atkins, y Langford, 2004).	46
Figura 21. Esquema general de la obtención de los patrones de difracción de una estructura cristalina (Atkins y Jones, 2006).	47
Figura 22. Descripción bidimensional de la reflexión de una haz de rayos X en dos planos paralelos de un cristal (Serway y Jewett, 2004).....	48
Figura 23. Microscopio electrónico de transmisión (Tortora et al., 2007).	49
Figura 24. Microscopio electrónico de barrido (Tortora et al., 2007).	51
Figura 25. Esquema del espectroscopio de dispersión de rayos X acoplado al microscopio electrónico de barrido (Vásquez y Echeverría, 2000).....	52
Figura 26. Transiciones electrónicas de absorción y fluorescencia (Devlin, 2004).	54
Figura 27. Esquema general de un espectrofluorómetro (Freifelder, 2003).	55
Figura 28. La frecuencia requerida para producir vibraciones en los enlaces es proporcional a la fuerza de éstos (Bailey y Bailey, 1998).	56
Figura 29. Diferentes vibraciones moleculares causadas al hacer incidir radiación infrarroja (Bailey y Bailey, 1998).	57
Figura 30. Espectrofotómetro de infrarrojo (Allinger et al., 1984).	58
Figura 31. Esquema de la reacción de funcionalización de las nanopartículas de hidroxiapatita impurificada con disprosio (HAp:Dy ³⁺) con la proteína albúmina sérica bovina (BSA).	61
Figura 32. Síntesis de HAp:Dy ³⁺ por el método sol-gel.	65
Figura 33. Patrones de XRD. a) Hidroxiapatita pura (Aldrich, 99 %, USA), b) HAp:0.5 Dy ³⁺ a 800 °C por 3 h y c) HAp:0.5 Dy ³⁺ a 1000 °C por 3 h.	71
Figura 34. Patrones de XRD. a) Hidroxiapatita pura (Aldrich, 99 %, USA), b) HAp:5 Dy ³⁺ a 800 °C por 3 h y c) HAp:5 Dy ³⁺ a 1000 °C por 3 h.	72
Figura 35. Imágenes de SEM de HAp:0.5 Dy ³⁺ . a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h....	73
Figura 36. Imágenes de SEM de HAp:5 Dy ³⁺ . a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h.....	74

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura 37. Espectro EDS de HAp:0.5 Dy ³⁺ . a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h.	75
Figura 38. Espectro EDS de HAp:5 Dy ³⁺ . a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h.	75
Figura 39. Imágenes de TEM de HAp:5 Dy ³⁺ . a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h.	76
Figura 40. Imágenes de TEM de HAp:5 Dy ³⁺ con un tratamiento térmico de 800 °C por 3 h. a) Imagen de baja resolución y b) Imagen de alta resolución de mostrando los planos [100] separados por 0.82 nm.	77
Figura 41. Espectros de excitación de HAp:0.5 Dy ³⁺ . a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h.	78
Figura 42. Espectros de excitación de HAp:5 Dy ³⁺ . a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h.	79
Figura 43. Espectros de emisión HAp:0.5 Dy ³⁺ . a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h....	80
Figura 44. Espectros de emisión HAp:5 Dy ³⁺ . a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h.....	81
Figura 45. Comportamiento de la intensidad de la emisión de la HAp:Dy ³⁺ en función de la impurificación y la longitud de onda. Tratamiento térmico de 800 °C por 3 h.	84
Figura 46. Comportamiento de la intensidad de la emisión de la HAp:Dy ³⁺ en función de la impurificación y la longitud de onda. Tratamiento térmico de 1000 °C por 3 h.	85
Figura 47. Espectros de excitación y emisión HAp:0.5 Dy ³⁺ . a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. Emisión en $\lambda_{ex} = 350$ nm y excitación en $\lambda_{em} = 574$ nm.	86
Figura 48. Espectros de excitación y emisión HAp:5 Dy ³⁺ . a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. Emisión en $\lambda_{ex} = 341$ nm y excitación en $\lambda_{em} = 592$ nm.	87
Figura 49. Espectros de emisión de HAp:0.5 Dy ³⁺ en agua bajo diferentes pH. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. $\lambda_{ex} = 350$ nm.	88
Figura 50. Espectros de emisión de HAp:0.5 Dy ³⁺ en agua bajo diferentes valores de pH. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. $\lambda_{ex} = 350$ nm.	89
Figura 51. Espectros de la estabilidad de emisión de HAp:Dy ³⁺ en agua a pH 7.2. Tratamiento térmico de 800 °C por 3 h. a) 0.5% de impurificación y b) 5% de impurificación. $\lambda_{ex} = 350$ nm.	90
Figura 52. Espectro de emisión de HAp:0.5 Dy ³⁺ en orina. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. $\lambda_{ex} = 350$ nm.	91
Figura 53. Espectro de emisión de HAp:5 Dy ³⁺ en orina. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. $\lambda_{ex} = 350$ nm.	91
Figura 54. Espectros de emisión de HAp:0.5 Dy ³⁺ en suero sanguíneo. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. $\lambda_{ex} = 350$ nm.	93

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura 55. Espectros de emisión de HAp:5 Dy ³⁺ en suero sanguíneo. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. λ_{ex} = 350 nm.	93
Figura 56. Espectro IR de HAp:Dy ³⁺ y HAp:Dy ³⁺ @BSA. Tratamiento térmico de 800 °C por 3 h. a) 0.5% de impurificación y b) 5% de impurificación.	95
Figura 57. Espectros de emisión de HAp:0.5 Dy ³⁺ funcionalizada con BSA. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. λ_{ex} = 350 nm.	96
Figura 58. Espectros de emisión de HAp:5 Dy ³⁺ funcionalizada con BSA. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. λ_{ex} = 350 nm.	97
Figura 59. Espectros de emisión de HAp:0.5 Dy ³⁺ en fluidos. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. λ_{ex} = 350 nm.	99
Figura 60. Espectros de emisión de HAp:5 Dy ³⁺ en fluidos. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. λ_{ex} = 350 nm.	100

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Características que deben tener las biocerámicas (Bronzino et al., 2000).	3
Tabla II. Aplicaciones de las biocerámicas.	4
Tabla III. Clasificación de los distintos tipos de luminiscencia según la forma de excitación (Fuentes et al., 1998a).	14
Tabla IV. La serie de los lantánidos y sus configuraciones electrónicas correspondientes. ..	21
Tabla V. Características generales del disprosio (Enghag, 2007).	22
Tabla VI. Características de la hidroxiapatita sintética (LeGeros et al., 2009).	27
Tabla VII. Composición de la orina recolectada en 24 h (Strasinger y Schaub, 2010).	36
Tabla VIII. Composición del plasma sanguíneo (Ross y Pawlina, 2008).	37
Tabla IX. Composición de aminoácidos de la albúmina sérica bovina (Bloomfield, 1966; Hirayama, Akashi et al., 1990).	41
Tabla X. Representación del proceso de conjugación de las nanopartículas inorgánicas. El círculo rojo representa a las NPs y el óvalo azul representa el enlace destinado para la funcionalización (Nam et al., 2012).	60
Tabla XI. Preparación de las muestras para funcionalización.	68

I. Introducción

El empleo de materiales y sustancias de origen natural o sintético, en el tratamiento de enfermedades, remplazos de tejido o funciones del cuerpo no es reciente. Existen reportes que muestran que los aztecas, los romanos y los chinos utilizaban materiales como oro, huesos, vidrio o madera para llevar a cabo implantes e intentar reparar cualquier tipo de tejido dañado. Estos reportes tienen una antigüedad de más de 2000 años (Campa J. et al., 2007; Hollinger, 2012; Ratner, 1996). Durante gran parte de la historia, la utilización de vidrio y madera como materiales de remplazos de tejidos del cuerpo fue de uso común. A finales del siglo XIX, se intentaron implantes con metales como el cobre y el bronce, mismos que sufrían una intensa corrosión dentro del organismo humano, provocando infecciones que ponían en riesgo la vida de los pacientes (Bhat, 2005; Campa J. et al., 2007). A principios del siglo XX el plástico sintético ya estaba disponible, lo que llevó a realizar muchos implantes experimentales, los cuales fueron un rotundo fracaso debido al desconocimiento de la toxicidad de los materiales (Campa J. et al., 2007; Ratner, 1996).

En 1937, se introdujo, el polimetilmetacrilato (PMMA) que se empezó a utilizar en implantes de tipo odontológicos, oftalmológicos y ortopédicos (Campa J. et al., 2007; Ratner, 1996). A partir de entonces, se introdujeron las prótesis arteriales de dacrón, de cadera a base de acero inoxidable combinado con PMMA y polietileno, entre muchas otras. El desarrollo de materiales para aplicaciones en medicina empezó a evolucionar y se introdujo el término biomateriales. Es difícil precisar el origen del término biomateriales; sin embargo, es probable que este campo fuera reconocido a partir del simposio de biomateriales de la Universidad de Clemson, en Carolina del Sur, a finales de la década de 1960 y principios de la década de 1970 (Ratner, 1996).

Un biomaterial es un material destinado a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar o remplazar cualquier tejido, órgano o función en el cuerpo (Hollinger,

2012). Esta habilidad de interacción de los biomateriales en funciones *in situ* con una respuesta del huésped apropiada y predecible en una aplicación específica, se conoce como biocompatibilidad. Lo más importante de la biocompatibilidad de un material es la manera en que su composición química influye en la respuesta de transducción de las proteínas, de las células y del organismo (Ratner, 1996).

Un material biocompatible puede considerarse “inerte” cuando no hay reacción alguna con el tejido y es estable por periodos indefinidos de tiempo; “bioactivo”, si existen interacciones específicas con el tejido circundante; “bioabsorbible” si se disuelve dentro del cuerpo a través de una actividad celular y el espacio vacante se ocupa eventualmente con tejidos; y finalmente, “biodegradable” si el material se descompone en sus elementos químicos gradualmente, debido a una actividad biológica o bioquímica específica (Campa J. et al., 2007; Ratner, 1996).

En la actualidad existe una amplia diversidad y sofisticación de biomateriales que son comúnmente utilizados en ciencias médicas. Estos son testimonio de los avances significativos que han ocurrido en los últimos 25 años. Los biomateriales se pueden catalogar de manera sencilla en tres clases: cerámicas, metales y polímeros (Ratner, 1996). En el caso de las cerámicas, son materiales sólidos que están esencialmente compuestos por sustancias inorgánicas y no metálicas (E. J. D. Bronzino, Raton, y Press, 2000). Las cerámicas son refractarios, compuestos policristalinos, usualmente inorgánicos, incluidos los silicatos, alcóxidos de metales y varios hidruros, sulfuros, y selenuros. Así como los óxidos Al_2O_3 , MgO , SiO_2 , y ZrO_2 que contienen elementos metálicos y no metálicos, y sales iónicas como NaCl , CsCl y ZnS . Excepciones a lo anterior se encuentran en las cerámicas que tienen enlaces covalentes como el diamante y estructuras carbonáceas como el grafito y el carbono pirolizado (E. J. D. Bronzino et al., 2000).

Las cerámicas que son destinadas a ser utilizadas dentro de un organismo vivo se conocen como biocerámicas y deben poseer las características que se muestran en la Tabla I. Pueden ser clasificadas como no absorbibles (relativamente inertes), bioactivas o de

superficie reactiva (semi-inertes) y biodegradables o bioabsorbibles (Bronzino, 2000). Las biocerámicas están constituidas por combinaciones de enlaces iónicos y covalentes que les proporcionan características como libertad de compresión, dureza, resistencia al desgaste, y alta resistencia a la corrosión (Ratner, 1996). Estas características juegan un papel importante y brindan ventajas sobre las aplicaciones que pueden tener como biomateriales.

Tabla I. Características que deben tener las biocerámicas (Bronzino et al., 2000).

Características
1. No tóxicas
2. No carcinogénicas
3. No alérgicas
4. No presentar propiedades inflamatorias
5. Biocompatibles
6. Biofuncionales mientras se encuentren dentro del cuerpo

Las aplicaciones de los biomateriales se pueden categorizar en tres niveles dependiendo de sus dimensiones: macrométricos = 10^{-3} m en adelante, micrométricos = 10^{-6} m, y nanométricos = 10^{-9} m (Clark y Pazdernik, 2012). En la actualidad existen un sinnúmero de aplicaciones dentro de estas categorías, en el caso de las biocerámicas algunos ejemplos se pueden observar en la Tabla II.

Tabla II. Aplicaciones de las biocerámicas.

Macrométricos	Micrométricos	Nanométricos
Reemplazo de huesos	Compositos para reparaciones de tejido óseo	Herramientas de diagnóstico
Implantes dentales	Recubrimiento para prótesis hechas de metal	Marcaje fluorescente y codificación óptica
Implantes oculares	Dispositivos liberadores de medicamento	Detección de microorganismos patógenos o proteínas específicas
Reconstrucción de huesos	Material de reparación ósea	Teranósticos en medicina personalizada

En el caso de las aplicaciones a niveles nanométricos en las ciencias de la vida se han desarrollado por décadas, formándose así un nuevo campo interdisciplinario entre la medicina, biología, toxicología, farmacología, química, ciencia de materiales, ingeniería, y las matemáticas llamado, nanomedicina. En la actualidad, la nanomedicina está demostrando prometedores resultados que van desde nanodispositivos implementados en diversas fases de preclínicas y clínicas, hasta muchos otros que se encuentran en fase de desarrollo (Janib, Moses, y MacKay, 2010; Rai et al., 2010; Torchilin, 2006).

La nanomedicina consiste en la investigación, el desarrollo y la aplicación de materiales a escalas de longitud entre 1 a 100 nm (nanomateriales) (Figura 1) para el tratamiento y la detección de enfermedades (Huang, Barua, Sharma, Dey, y Rege, 2011; Vo-Dinh, 2007). Los nanomateriales ofrecen ventajas como herramientas terapéuticas y de diagnóstico debido a su diseño flexible, tamaño, gran área superficial, y la facilidad que presentan de poder funcionalizar sus superficies con proteínas, fármacos, péptidos, o ligandos de interés (pequeñas moléculas que se unen a otras más grandes) para aumentar la avidéz por blancos moleculares o celulares (Huang et al., 2011; Nelson, Cox, y Lehninger, 2008; X.-Q. Zhang et al., 2012).

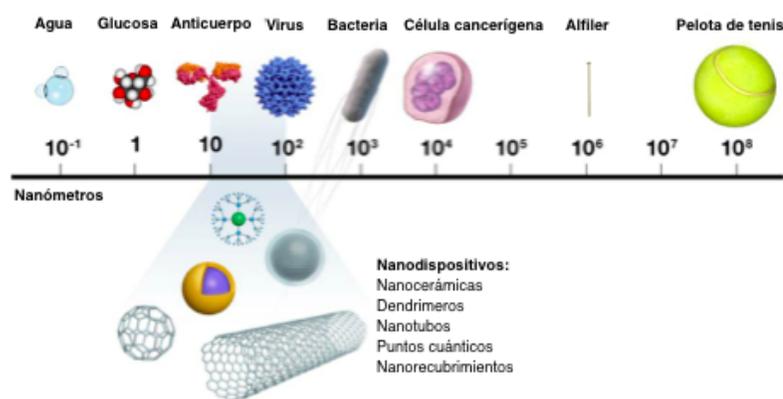


Figura 1. Comparación de escalas de los nanomateriales (Castro, 2012).

En la actualidad, en nanomedicina se están desarrollando nanopartículas multifuncionales con la finalidad de que puedan funcionar como teranósticos (Janowski, Bulte, y Walczak, 2012). Un teranóstico es un sistema integrado por una nanoplataforma capaz de diagnosticar, aplicar una terapia dirigida, y monitorizar la respuesta al tratamiento (Janib et al., 2010; Rai et al., 2010).

En el desarrollo de estas nanopartículas teranósticas (TNP) se encuentran involucrados los sistemas de imagen médica, incluyendo las imágenes por resonancia magnética (MRI), los rayos X de tomografía computarizada (CT), tomografía por emisión de positrones (PET), imágenes por emisión de fotón único (SPECT), imágenes de bioluminiscencia (BLI), imágenes fluorescentes (FLI), y ultrasonido (US) (Ai, 2011; H. Yang et al., 2011). Cada modalidad de sistema de imagen tiene sus propias ventajas y desventajas en términos de resolución espacial, blanco, y profundidad de penetración (Ai, 2011). Para aprovechar las ventajas que los sistemas de imagen ofrecen se desarrollan TNP con propiedades magnéticas, radioluminiscentes, fosforescentes, bioluminiscentes, fluorescentes, o con la combinación de estas propiedades dependiendo de la modalidad de imagen médica a utilizar (Janib et al., 2010; Janowski et al., 2012; Rai et al., 2010).

Las TNP pueden tener mecanismos de acumulación selectiva, activación del medicamento, o de un agente de contraste. Un TNP ideal puede tener la orientación molecular que permita la obtención de imágenes durante su circulación en el cuerpo. Al llegar a su destino, las TNP pueden interaccionar con receptores de superficie celular específicos a través de ligandos que reconozcan al blanco, introducirse en el citosol, reconocer a un objetivo intracelular si es necesario, y liberar el activo terapéutico (Janib et al., 2010).

Hasta ahora, una amplia gama de nanoplataformas han sido investigadas y desarrolladas como TNP. Por ejemplo, polímeros, dendrímeros, hidrogeles, nanotubos de carbono, micelas, péptidos, vesículas, estructuras recubiertas, nanopartículas de oro, y nanopartículas de cerámicas (Ai, 2011; Hou et al., 2009, 2011; P. Yang et al., 2008; P. Yang, Yang, Teng, Lin, y Huang, 2011). En el caso de las nanopartículas cerámicas, la hidroxiapatita presenta ventajas como lo son: una profunda penetración en los tejidos para la obtención de imágenes, un bajo costo, y una manera relativamente fácil de sintetizarla, una alta biocompatibilidad y estabilidad (Huang et al., 2011).

Las nanopartículas de hidroxiapatita [HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] tienen la misma composición que el mineral de los huesos y dientes humanos. Por lo cual, presentan propiedades de no toxicidad, no inflamación, osteoconductividad y bioactividad (Graeve, Kanakala, Madadi, Williams, y Glass, 2010; H. Liu et al., 2011). Además, pueden ser cinéticamente estables en los fluidos corporales (L. Li et al., 2008; C. Zhang et al., 2009). La HAp presenta una superficie porosa que puede ser usada para cargar el terapéutico aplicando presión, esto permite que el medicamento se mantenga intacto durante la carga y liberación. Asimismo, tiene una alta superficie específica y grupos OH^- que pueden ser utilizados para funcionalizar ligandos específicos, terapéuticos o agentes de contraste (Hou et al., 2009; H. Liu et al., 2011; P. Yang et al., 2008).

Las nanopartículas de HAp, como parte de una plataforma ideal para el desarrollo de teranósticos, permite la sustitución de los iones de calcio de la molécula por diferentes elementos con características específicas, por ejemplo, iones de la serie de los lantánidos. Al sustituir a los iones Ca^{2+} por iones trivalentes como el Eu^{3+} , Dy^{3+} y Tb^{3+} , las nanopartículas de HAp pueden exhibir una fuerte fluorescencia bajo una fuente de radiación electromagnética (L. Li et al., 2008). El uso de lantánidos como elementos activadores para la sustitución de los iones de calcio exhiben ventajas como una alta eficiencia en la luminiscencia, estabilidad térmica y química, y baja energía de resonancia. Lo que indica un menor uso de energía para su excitación, una larga emisión, y baja toxicidad (Gai et al., 2011; Hou et al., 2011; Nam et al., 2012).

Con base en lo anterior, el objetivo de esta tesis es desarrollar nanopartículas de hidroxiapatita impurificada con Dy^{3+} (HAp:Dy^{3+}), evaluar sus propiedades luminiscentes en diferentes condiciones y fluidos. Finalmente, funcionalizar el material con una proteína. Esto con la finalidad de que las nanopartículas de HAp:Dy^{3+} puedan ser consideradas como una plataforma ideal para el desarrollo de sistemas teranósticos para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Las nanopartículas de hidroxiapatita impurificada con iones de disprosio (HAp:Dy³⁺) presentan propiedades luminiscentes estables en diferentes fluidos y se pueden funcionalizar con albúmina sérica bovina (BSA). Asimismo, presentan propiedades potenciales para funcionar como una plataforma ideal para el desarrollo de teranósticos.

Objetivo general

Sintetizar y caracterizar nanopartículas de HAp:Dy³⁺, evaluar sus propiedades luminiscentes en diferentes fluidos y funcionalizarlas con albúmina sérica bovina (BSA).

Objetivos específicos

1. Sintetizar nanopartículas de HAp:Dy³⁺ por medio del método químico sol-gel asistido con ácido tartárico, con diferentes concentraciones de iones Dy³⁺ partiendo de Dy(NO₃)₃.
2. Obtener nanopartículas de HAp:Dy³⁺ ≤ 100 nm.
3. Realizar análisis de fotoluminiscencia (PL) para determinar los espectros de excitación y emisión de la nanopartículas de HAp:Dy³⁺ y determinar la concentración de Dy³⁺ a las cuales se presenten propiedades fluorescentes superiores.

4. Caracterizar la estructura cristalina y composición del material por difracción de rayos X (XRD) y espectroscopía de dispersión de energía (EDS), la morfología y tamaño de las partículas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM).
5. Caracterizar las propiedades fotoluminiscentes y el comportamiento de la HAp:Dy³⁺ inmersa en agua con diferentes valores de pH, en orina y en suero humano.
6. Funcionalizar las nanopartículas de HAp:Dy³⁺ con albúmina sérica bovina (BSA).

II. Marco teórico

II.1 El espectro electromagnético

Las ondas electromagnéticas son formas de energía radiante constituidas por la oscilación conjunta de un campo eléctrico y un campo magnético que se propagan por el espacio a una velocidad continua de 3.00×10^8 m/s (velocidad de la luz). El campo eléctrico se produce por la presencia de cargas y es perpendicular al campo magnético que se genera por el movimiento de las cargas, ambos campos se regeneran entre sí constantemente (Figura 2) (Picado y Álvarez, 2008; Rodríguez y Sánchez, 2005).

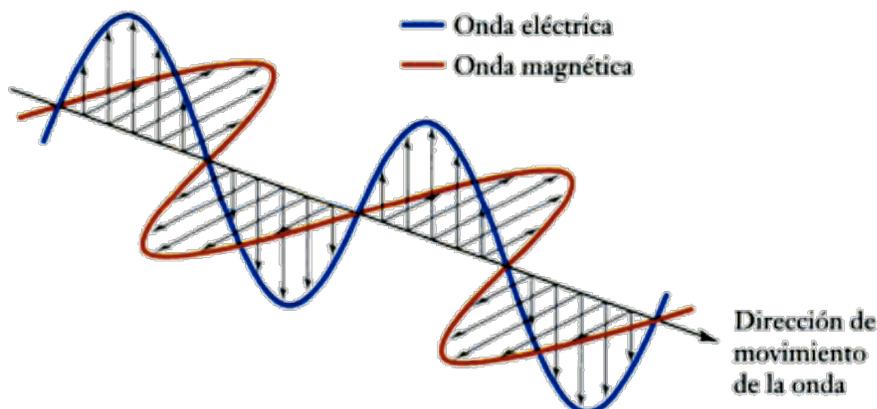


Figura 2. Oscilación de una onda electromagnética (Rodríguez y Sánchez, 2005).

La distancia entre dos crestas de una onda electromagnética se denomina longitud de onda (λ) y la altura de las crestas de la onda se denomina amplitud. El número de veces que la onda completa un ciclo en un segundo se define como frecuencia (ν) y la relación entre la longitud de onda y la frecuencia se denomina velocidad de la onda (c). Esta relación se

expresa mediante la ecuación $c = \lambda\nu$. Por lo que a medida que la longitud de onda aumenta, la frecuencia disminuye y viceversa (Figura 3) (Burns, 2003; Rodríguez y Sánchez, 2005).

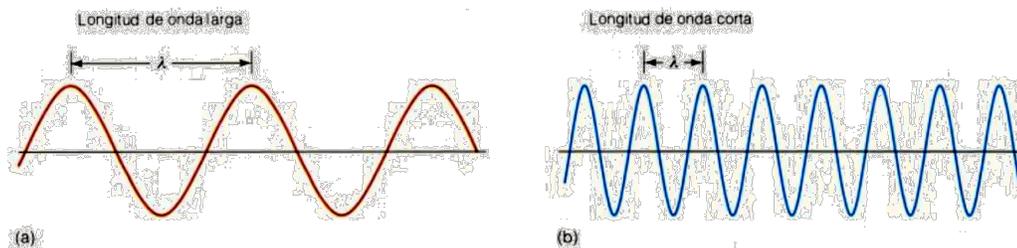


Figura 3. Relación de la frecuencia y la longitud de onda. Las frecuencias bajas tienen longitudes de onda largas (a) y las frecuencias altas tienen longitudes de onda cortas (b) (Burns, 2003).

Las ondas electromagnéticas emitidas o absorbidas por los átomos y moléculas abarcan espectros de longitudes de onda desde 10^{-18} a 10^7 m. Al conjunto ordenado de estas ondas electromagnéticas, se le conoce como espectro electromagnético. El espectro electromagnético está conformado por diferentes regiones determinadas, la región del espectro que el ojo humano puede detectar se conoce como luz visible y abarca desde una longitud de onda de 400 nm que corresponde al color violeta hasta aproximadamente una longitud de onda de 750 nm que corresponde al color rojo. Por debajo de la fracción visible con longitudes de onda más cortas se encuentra la región del ultravioleta (UV) cuyo rango es de alrededor de los 4 nm hasta los 400 nm, las longitudes de onda más próximas a la región del visible se denominan UV cercano (321-400 nm) y las más distantes UV lejano (280-320 nm). Por debajo de la región ultravioleta se encuentra los rayos X cuya región abarca desde alrededor de 0.1 nm hasta 10 nm. Por encima de la región del visible se encuentra la región del infrarrojo (IR) que abarca una región desde los 770 nm hasta aproximadamente 1000 μm y se divide en IR cercano (770 nm-2500 nm), IR medio (2500 nm-5000 nm) e IR lejano (5000 nm-1000 μm) (Figura 4) (Burns, 2003; Ford y Freedman, 2005; McMurry y Cervantes, 2008).

Las regiones del espectro electromagnético interactúan de maneras diferentes con la materia dependiendo de las longitudes de onda: cuando una longitud de onda determinada se encuentra con un átomo, el campo eléctrico de la onda interfiere con la carga del electrón. Como consecuencia, puede suceder que la onda le entregue su energía al átomo y éste presente una respuesta determinada, que la energía tenga un efecto o no sobre el átomo depende de que éste pueda aceptar la energía recibida (Picado y Álvarez, 2008).

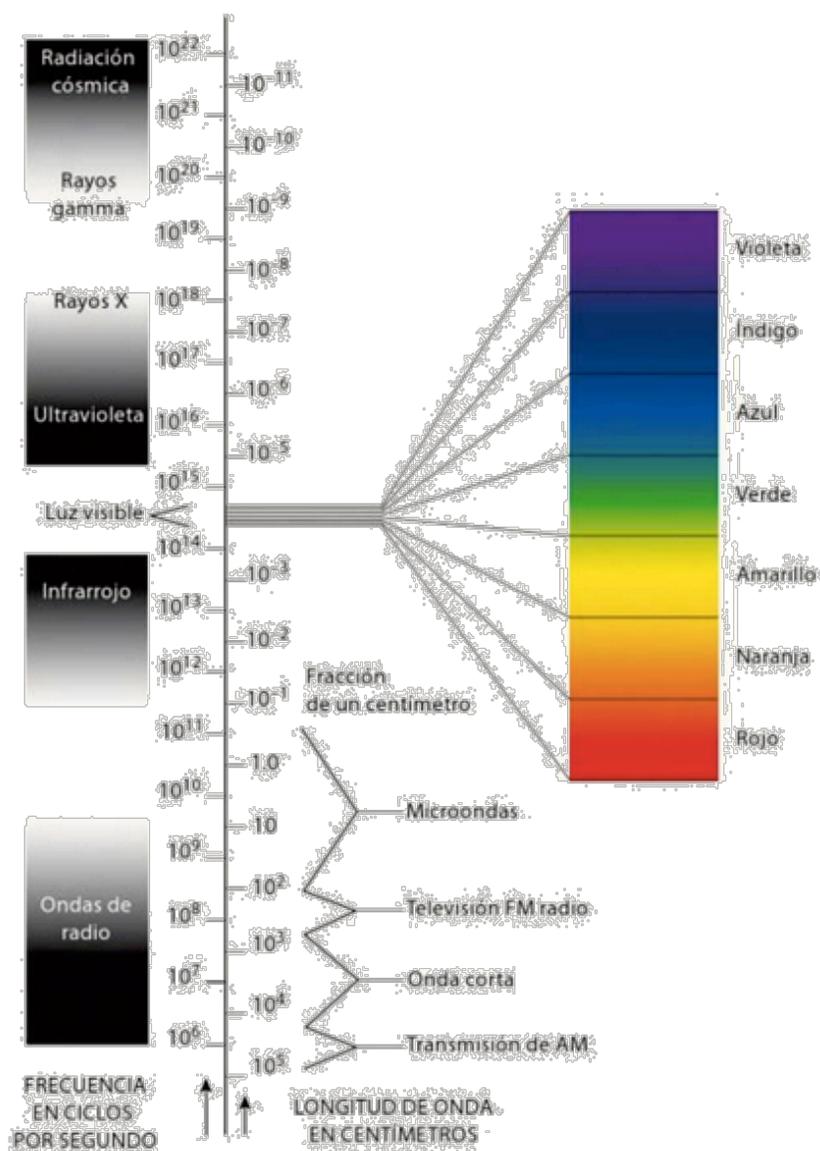


Figura 4. El espectro electromagnético (Peña, 2004).

II.2 Luminiscencia

La luminiscencia es la emisión de luz (fotones) mediante un proceso de relajación electrónica desde un estado excitado a un estado fundamental. En condiciones normales y estables los átomos y moléculas se encuentran en su estado de menor energía o estado basal donde la energía de sus núcleos, sus orbitales atómicos, sus movimientos de vibración, translación y rotación se mantienen constantes pero con niveles bajos de energía y con un gasto mínimo de la misma (Fuentes, Castiñeiras, y Queraltó, 1998a).

Cuando los electrones de un átomo ocupan los niveles más bajos de energía de los orbitales, se dice que se encuentran en su estado fundamental. Si el átomo absorbe energía de una fuente externa, los electrones del estado fundamental pasan de ocupar niveles de mayor energía (estado excitado) lo que produce un cambio en el ordenamiento de los electrones en los orbitales por un período de tiempo finito, finalmente los electrones regresan a ocupar los niveles de mínima energía. Durante esta transición, del estado excitado al estado fundamental, el exceso de energía puede ser liberado en forma de fotones que dependen de la fuente de energía externa y de la capacidad de los átomos para absorber la energía suministrada (Devlin, 2004; Fuentes et al., 1998a).

Los diferentes tipos de luminiscencia reciben su nombre dependiendo de la fuente de energía externa utilizada para excitar al material luminiscente. Si es excitado mediante radiación electromagnética (fotones) se denomina fotoluminiscencia y dependiendo del tiempo de duración de la emisión se puede clasificar como fluorescencia y fosforescencia. Cuando una molécula es excitada por una reacción bioquímica se llama bioluminiscencia, si la fuente de excitación es una reacción química se llama quimioluminiscencia. La excitación realizada mediante la aplicación un campo eléctrico se denomina electroluminiscencia. Cuando la excitación se realiza mediante un haz de electrones se llama catodoluminiscencia. La triboluminiscencia se da cuando la fuente de excitación es mediante trituración o fricción mecánica. Finalmente, cuando la excitación se produce mediante la estimulación térmica del material se denomina termoluminiscencia (Tabla III)

(Blasse y Grabmaier, 1994; Fernández, 2003; Fuentes et al., 1998a; Vásquez, y Echeverría, 2000).

Tabla III. Clasificación de los distintos tipos de luminiscencia según la forma de excitación (Fuentes et al., 1998a).

Forma de excitación	Tipos de luminiscencia
Radiación ultravioleta / visible	Fotoluminiscencia
Radiaciones químicas y bioquímicas	Quimioluminiscencia Bioluminiscencia
Estimulación térmica	Termoluminiscencia
Campo eléctrico	Electroluminiscencia
Esfuerzos mecánicos	Triboluminiscencia

II.2.1 Teoría de la fotoluminiscencia

La fotoluminiscencia es el proceso de emisión de fotones basada en la excitación de átomos y moléculas mediante la absorción de un haz de radiación electromagnética. Este fenómeno óptico presenta dos formas de emisión: la fluorescencia y la fosforescencia (Skoog, West, y Holler, 2001).

Los electrones en un átomo se encuentran ordenados en orbitales atómicos (capas) con diferentes niveles de energía, los niveles más cercanos al núcleo poseen menor energía y los más alejados poseen mayor energía. Cada nivel de energía de un átomo comprende uno o más subniveles (subcapas), el nivel uno tiene un subnivel; el nivel dos tiene dos subniveles, y así sucesivamente. Cada subnivel tiene uno o más orbitales que se designan con las letras *s*, *p*, *d* y *f*. Cada orbital pueden tener como máximo dos electrones, pero estos deben girar en direcciones opuestas, es decir, deben tener espines opuestos (Skoog, Holler, y Crouch, 2008).

Cuando los electrones son excitados pasan a ocupar un nivel de energía superior en un orbital más alejado al núcleo, dependiendo de la dirección del espín del electrón se habla de un estado sencillo o uno triple. En un estado excitado sencillo el espín continúa siendo

opuesto respecto al electrón del estado fundamental, y en un estado excitado triple la dirección del espín del electrón cambia y pasa a ser la misma que la del estado fundamental (Figura 5). El estado excitado sencillo presenta mayor energía y tiene mayor probabilidad de ocurrir que el estado triple excitado. El estado triple tiene propiedades magnéticas y en presencia de un campo magnético se desdobra en tres subniveles de energía (Burns, 2003; Fuentes et al., 1998a; Skoog et al., 2008).

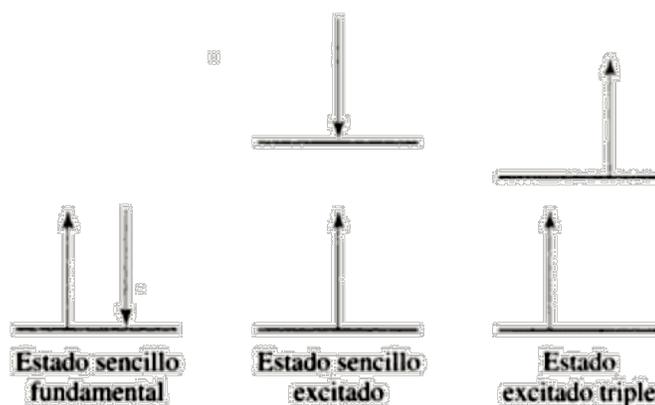


Figura 5. Estados electrónicos del espín de un átomo (Skoog et al., 2008).

La forma de fotoluminiscencia, al excitar los átomos y moléculas mediante un haz de luz, depende del estado electrónico del espín. Si se produce una transición desde el estado sencillo excitado al estado fundamental y el estado excitado tiene un tiempo de vida de alrededor de 10^{-8} s, la forma de emisión es la fluorescencia. En cambio si la transición se produce del estado excitado triple al fundamental pasando por un estado excitado metaestable, que permite que la duración de la emisión sea mucho mayor, desde 10^{-4} segundos hasta incluso días, la forma de emisión es la fosforescencia. Asimismo, en el proceso de fosforescencia implica una menor pérdida de energía en comparación con la fluorescencia (Fuentes et al., 1998a; Skoog et al., 2008).

II.2.1.1 Fluorescencia

En el proceso de fluorescencia la emisión es de menor energía que la excitación, esto se debe al equilibrio vibracional que ocurre durante la transición del estado fundamental al estado excitado. La energía E tiene una relación con la frecuencia vibracional ν mediante la ecuación $E = h\nu$, donde h es la constante de Planck ($6.62606896 \times 10^{-34}$ Js), y la frecuencia (ν) se relaciona con la longitud de onda (λ) de acuerdo a la ecuación $\nu = c/\lambda$, donde c es la velocidad de la luz. Por consiguiente, $E = hc/\lambda$, lo que indica que la energía varía de manera inversa con la longitud de onda. Por ejemplo, la fluorescencia en el visible se observa cuando la fuente de excitación es radiación ultravioleta (Fuentes et al., 1998a; Skoog et al., 2008).

Debido al equilibrio vibracional, en la fluorescencia el espectro de emisión tiene cierta simetría con el espectro de excitación (Figura 6), pero desplazado en longitud de onda, este desplazamiento a una longitud de onda más larga o de menor energía, se conoce como desplazamiento de Stokes (Fuentes et al., 1998a; Harris, 2007).

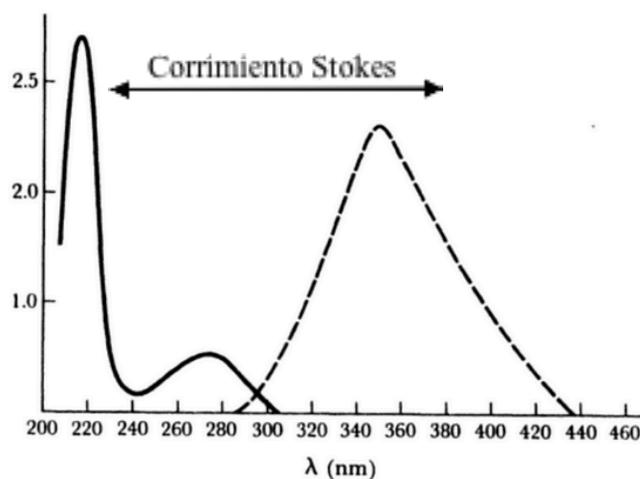


Figura 6. Espectros de excitación (línea continua) y emisión (línea punteada) de una molécula típica fluorescente y su desplazamiento de Stokes (Freifelder, 2003).

La estructura de los espectros de emisión y excitación de un material fluorescente se explican a través de un diagrama de Jablonski, en este diagrama se representan los estados electrónicos y los diferentes niveles de energía involucrados en el proceso de fluorescencia (Figura 7). En la Figura 7 el estado fundamental y sus cuatro subniveles se encuentran en la parte inferior, designados con S_0 . En condiciones normales y estables las moléculas y átomos se encuentran en S_0 . Los niveles de energía del estado excitado están representados por las dos líneas negras superiores denominadas S_1 y S_2 . Las líneas finas horizontales representan a los niveles de energías vibracionales (Skoog et al., 2008).

Cuando una molécula o un átomo absorbe un fotón, la transición del electrón ocurre desde el estado fundamental S_0 a varios niveles vibracionales de los estados sencillos excitados de S_1 y S_2 , en un tiempo aproximado de 10^{-14} a 10^{-15} s. Los electrones excitados en los estados S_1 y S_2 pierden rápidamente el exceso de energía vibracional y se relajan, adquiriendo el nivel vibracional fundamental de ese estado electrónico. En este caso, el electrón excitado puede volver a su estado fundamental por dos mecanismos de desactivación, el primero mediante la emisión de un fotón (representado por las flechas verticales en la Figura 7) a una velocidad de entre 10^{-5} a 10^{-10} s, y el segundo mediante una relajación no radiante (indicada con flechas onduladas). De estos dos posibles mecanismos, se produce aquel que reduce el tiempo de vida del estado excitado. Si la desactivación del estado excitado por fluorescencia es más rápida que el mecanismo no radiante se observa la emisión de luz, en un caso contrario no se presenta la emisión luminiscente. Las características estructurales y del entorno, de los átomos y moléculas en un material, determinan la posibilidad de llevar a cabo el proceso de emisión de fotones (Blasse y Grabmaier, 1994; Skoog et al., 2008, 2001).

Dentro de los niveles de energía vibracional del estado excitado y fundamental se lleva a cabo la relajación vibracional que se da a través de colisiones entre moléculas excitadas y sus alrededores con tiempos de vida es de aproximadamente 10^{-15} s. Durante las colisiones el exceso de energía se transfiere entre los diferentes niveles de energía y se produce un pequeño aumento de temperatura. Una consecuencia de la relajación vibracional es el

desplazamiento de Stokes. Además, pueden tener lugar conversiones internas y externas que son procesos menos eficaces que la relajación vibracional, causando que los electrones pasen de un estado electrónico a otro sin la producción de una emisión luminiscente. La conversión interna se da por procesos intermoleculares y es un cruce de estados, por ejemplo de S_2 a S_1 o de S_1 a S_0 . Este proceso ocurre cuando se da un traslape de los niveles de energía vibracionales. Finalmente, la conversión externa se da por una interacción del estado electrónico excitado con el medio o moléculas que lo rodean (Figura 7) (Skoog et al., 2008, 2001).

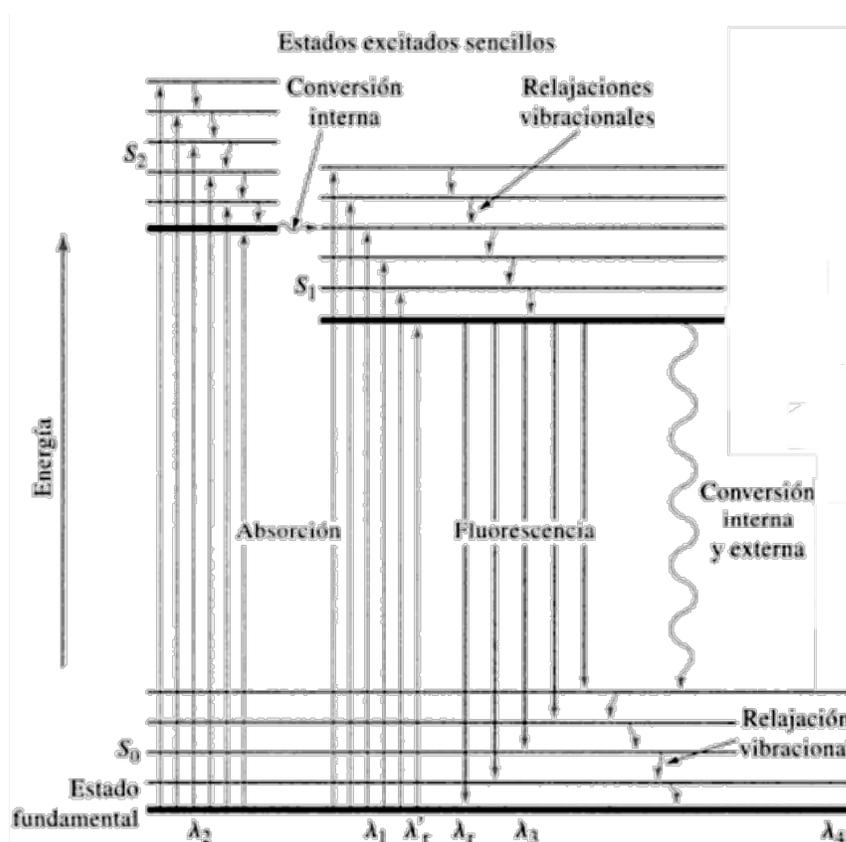


Figura 7. Diagrama de los niveles de energía de un sistema fluorescente (Skoog et al., 2008).

II.2.2 Materiales fluorescentes

Los materiales fluorescentes regularmente están constituidos por estructuras cristalinas inorgánicas (estructuras que se acomodan de manera ordenada siguiendo un patrón tridimensional) que hospedan un centro luminiscente (ión activador), en el cual se presentan transiciones electrónicas que dan origen a los procesos de emisión luminiscente (Figura 8) (Blasse y Grabmaier, 1994; Madhukumar et al., 2007).

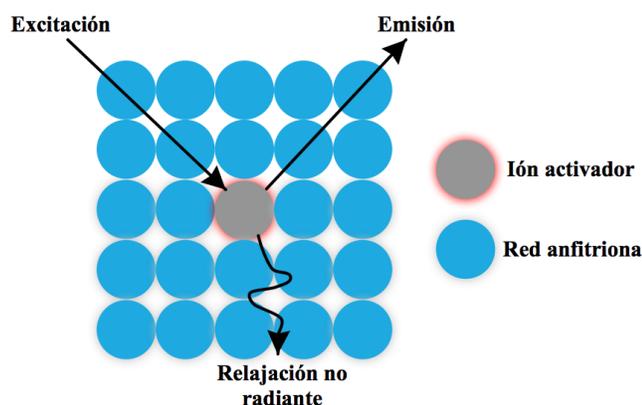


Figura 8. Proceso de fluorescencia de una red cristalina que hospeda a un ión activador.

La emisión de fotones en un material y sus características luminiscentes dependen de los iones activadores y su interacción con la estructura cristalina que lo hospeda. Las modificaciones energéticas que se dan entre esta interacción permiten competir cinéticamente con los procesos no radiativos, dando lugar a que ciertas transiciones del ión activador sucedan o no (Blasse y Grabmaier, 1994; Fernández, 2003).

Los principales iones activadores son los metales de transición del bloque *d* y los lantánidos del bloque *f*. En el caso de los metales de transición tienen incompletos los orbitales *d* y la fluorescencia se lleva a cabo por las transiciones de los electrones de estos orbitales. Las variaciones de la emisión luminiscente dependen del tipo y la estructura a la que esté unido el ión activador. Por otro lado, se encuentran los lantánidos que tienen

incompletos los orbitales $4f$, donde la emisión resulta poco influida por los iones de alrededor y por los cambios estructurales de la red anfitrión (Blasse y Grabmaier, 1994; Fernández, 2003).

Además de las estructuras cristalinas con impurificaciones de iones de metales de transición o iones lantánidos, y ciertos materiales, la fluorescencia también se presenta en las biomoléculas conformadas por compuestos alifáticos con grupos carbonilo, anillos aromáticos y algunas estructuras que presentan dobles enlaces (Fuentes et al., 1998a; Skoog et al., 2008).

II.2.3 Iones lantánidos

La serie de los lantánidos comprenden una serie de 15 elementos desde el lantano hasta el lutecio. Los iones lantánidos tienen una configuración electrónica general $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4s^2 4p^6 4d^{10} 5s^2 5p^6 4f^{0-14} 5s^2 5p^6$, los orbitales más externos de la serie permanecen casi invariables por lo que los iones presentan propiedades químicas muy semejantes. En cambio los orbitales internos de la capa $4f$ se caracterizan por poseer distintos números de electrones en los siete orbitales de la capa, y en su mayoría los iones tienen su capa $4f$ incompleta a excepción del lantano ($4f^0 5s^2 5p^6$) (sólo se muestra la configuración de los orbitales más externos) que la tiene completamente vacía y el lutecio ($4f^{14} 5s^2 5p^6$) que la tiene completamente llena (Cartmell y Fowles, 2003; Martí, Conde, Jimeno, y Méndez, 2008; Valenzuela, 1994).

La valencia característica de los iones lantánidos es $3+$, que se debe a que además de que puede ceder los dos electrones de $6s^2$ también puede ceder un electrón $4f^n$. Sin embargo algunos iones lantánidos pueden presentar valencias variables debido a la tendencia de éstos a formar estructuras estables. Por ejemplo el Ce, Pr, Nd, Tb, y Dy que pueden presentar tetravalencia, o el Eu, Sm, Er, e Yb que pueden presentar divalencia (Tabla IV) (Blasse y Grabmaier, 1994; Cartmell y Fowles, 2003; Christen, 1986; Wells, 1978).

Tabla IV. La serie de los lantánidos y sus configuraciones electrónicas correspondientes.

Número atómico	Elemento	Símbolo	Valencia	Átomo	Ión trivalente
57	Lantano	La	3+	$4f^1 5s^2 5p^6$	$4f^0$
58	Cerio	Ce	3+, 4+	$4f^2 5s^2 5p^6$	$4f^1$
59	Praseodimio	Pr	3+, 4+	$4f^3 5s^2 5p^6$	$4f^2$
60	Neodimio	Nd	3+, 4+	$4f^4 5s^2 5p^6$	$4f^3$
61	Promecio	Pm	3+	$4f^5 5s^2 5p^6$	$4f^4$
62	Samario	Sm	2+, 3+	$4f^6 5s^2 5p^6$	$4f^5$
63	Europio	Eu	2+, 3+	$4f^7 5s^2 5p^6$	$4f^6$
64	Gadolinio	Gd	3+	$4f^8 5s^2 5p^6$	$4f^7$
65	Terbio	Tb	3+, 4+	$4f^9 5s^2 5p^6$	$4f^8$
66	Disproseo	Dy	3+, 4+	$4f^{10} 5s^2 5p^6$	$4f^9$
67	Holmio	Ho	3+	$4f^{11} 5s^2 5p^6$	$4f^{10}$
68	Erbio	Er	2+, 3+	$4f^{12} 5s^2 5p^6$	$4f^{11}$
69	Tulio	Tm	3+	$4f^{13} 5s^2 5p^6$	$4f^{12}$
70	Iterbio	Yb	2+, 3+	$4f^{14} 5s^2 5p^6$	$4f^{13}$
71	Lutecio	Lu	3+	$4f^{14} 5s^2 5p^6$	$4f^{14}$

Con excepción del lantano y del lutecio, la serie lantánida del cerio al tulio presentan electrones fácilmente excitables, que al ser incorporados en una matriz sólida cristalina poseen propiedades ópticas características que distinguen a un ión de otro. Algunas propiedades son las transiciones específicas de cada ión en las regiones ultravioleta, visible e infrarrojo; y los espectros de absorción y emisión en forma de bandas muy estrechas, bien delimitadas donde sus posiciones son muy poco sensibles a la red que lo contiene debido a que los orbitales $4f$ se encuentran protegidos de las interacciones con fuerzas exteriores mediante los orbitales externos $5s^2 5p^6$. Asimismo, presentan un amplio rango electromagnético de excitación (Blasse y Grabmaier, 1994; Martí et al., 2008).

II.3 Disproso

El disproso es un metal perteneciente a la serie de los lantánidos, estable en el aire a temperatura ambiente. El elemento presenta una fuerte susceptibilidad magnética, y una configuración electrónica que le proporciona propiedades luminiscentes cuando es incorporado en matrices orgánicas o inorgánicas. (Conzone y Day, 2009; Enghag, 2007; Kattel et al., 2012; Nakashima et al., 2005). Las características generales del disproso se pueden observar en la Tabla V.

Tabla V. Características generales del disproso (Enghag, 2007).

Símbolo:	Dy
Número atómico:	66
Peso atómico:	162.50 g/mol
Configuración electrónica en estado base:	$[\text{Xe}]4f^{10}6s^2$
Configuración electrónica como ión trivalente:	$[\text{Xe}]4f^9$
Valencia más común:	3+
Estructura cristalina:	Hexagonal
Radio atómico:	1.77 Å
Radio iónico del Dy³⁺:	1.027 Å

II.3.1 Propiedades fotoluminiscentes del disproso

El disproso presenta propiedades luminiscentes interesantes, ya que puede emitir luz simultáneamente a diferentes longitudes de onda (emisiones en colores amarillo, azul, rojo o combinaciones de éstos) dependiendo de la matriz a la que se incorpore (Enghag, 2007; Mohammad Reza Ganjali et al., 2012; Lemanski y Deren, 2011; Mallick et al, 2008). La longitud o longitudes de onda que predominen en la emisión de luz del material dependerán de la estructura de la matriz y de la técnica de síntesis utilizada (Nagpure et al., 2009).

Las emisiones del Dy^{3+} provienen de las transiciones del nivel más bajo de energía del estado excitado $^4\text{F}_{9/2}$ hacia los niveles $^6\text{H}_{15/2}$, $^6\text{H}_{13/2}$, $^7\text{H}_{11/2}$ y $^7\text{H}_{9/2}$ del estado fundamental, las primeras dos transiciones suelen ser las más dominantes (Figura 9) (Blasse y Grabmaier, 1994; Song et al, 2011).

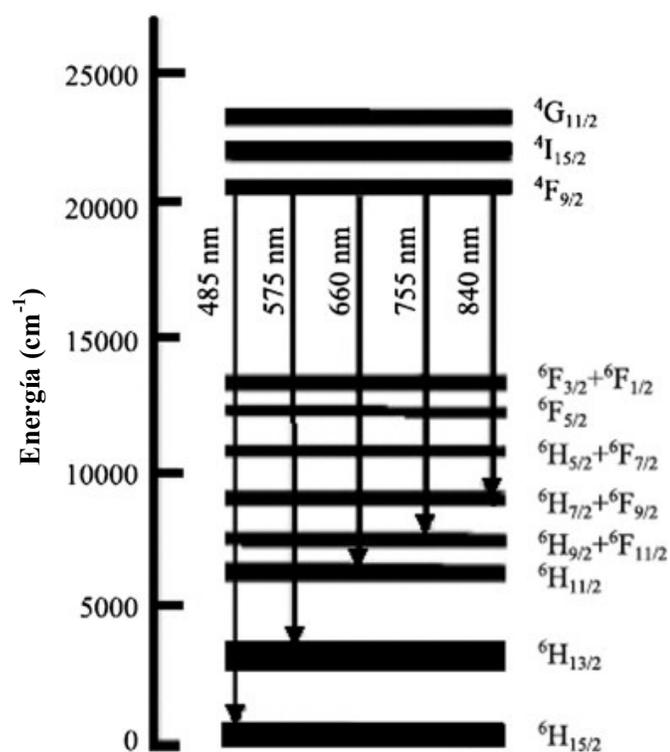


Figura 9. Los niveles de energía del Dy^{3+} y sus transiciones de emisión (Shinde et al., 2011).

El Dy^{3+} presenta cuatro transiciones típicas (Figura 10): la primera transición $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^6\text{H}_{15/2}$ centrada en los 485 nm correspondiente a la longitud de onda del color azul, la segunda transición $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^6\text{H}_{13/2}$ centrada en los 575 nm correspondiente al color amarillo que suele ser la más intensa, la tercera transición $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^7\text{H}_{11/2}$ centrada en los 660 nm correspondiente al color rojo y la cuarta transición $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^7\text{H}_{9/2}$ centrada en los 755 nm dentro de la región del infrarrojo (Blasse Grabmaier, 1994; Lemanski Deren, 2011; Madhukumar et al., 2007; Nagpure et al., 2009; Nakashima et al., 2005; Song et al., 2011).

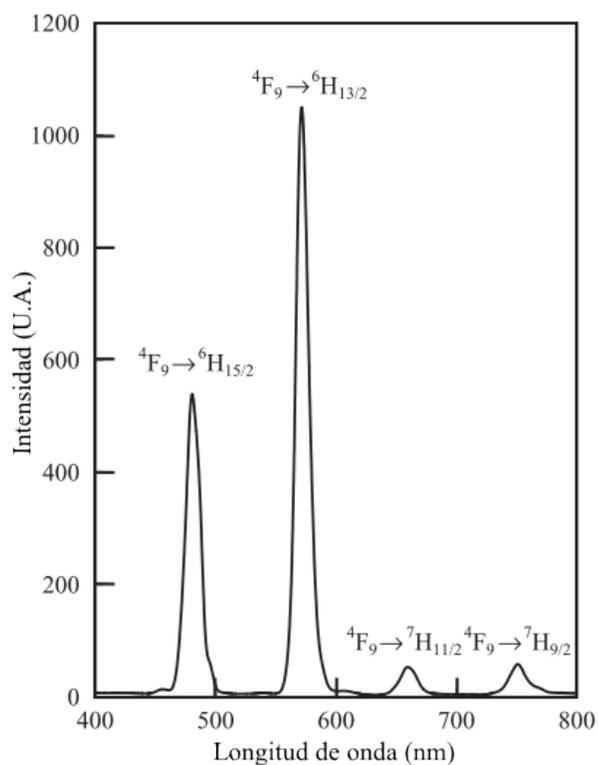


Figura 10. Espectro de emisión del fósforo $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2:\text{Dy}$. $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ (Nakashima et al., 2005).

II.3.2 Aplicaciones

El disprosio es comúnmente utilizado en materiales fluorescentes, materiales magnéticos y en ciencias de la vida como materiales de contraste. Dentro de las aplicaciones más importantes del disprosio se encuentran la utilización en materiales magnetostrictivos, que son aquellos materiales que cambian de dimensión cuando son magnetizados. Otra aplicación interesante es la del óxido de disprosio combinado con níquel que es utilizado para enfriar las barras de los reactores nucleares, debido a la habilidad del disprosio para absorber neutrones (Enghag, 2007; Mohammad Reza Ganjali et al., 2012).

En la actualidad la diversidad de materiales que presentan disprosio dentro de sus composiciones tienen aplicaciones en lámparas fluorescentes libres de mercurio, diodos

emisores de luz (LEDs), dispositivos de almacenaje, dosimetría, lámparas electroluminiscentes, turbinas de aire en energías verdes, carros eléctricos y como agentes de contraste en sistemas de imagen médica como tomografía computarizada y resonancia magnética (Hoenderdaal, Tercero Espinoza, Marscheider-Weidemann, Graus, 2013; Kattel et al., 2012; Madhukumar et al., 2007; Nagpure et al., 2009; Ortega et al., 2004; Song et al., 2011).

II.4 Hidroxiapatita

La hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAp) es un fosfato de calcio que se puede encontrar de manera natural o sintética. Dentro del cuerpo humano la hidroxiapatita es la fase mineral mayoritaria y la más importante de las fases inorgánicas que componen los tejidos óseos y dentales (J. D. Bronzino, 2000; LeGeros et al., 2009).

Los tejidos óseos están compuestos por una fase inorgánica que abarca alrededor del 69% del peso total, un 9% de agua y un 22% de una matriz orgánica (en su mayoría colágeno). Del 69% de la fase inorgánica, la $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ocupa alrededor del 80% de la fase, asimismo se encuentran presentes otros compuestos minerales como la hidroxiapatita con iones substituidos (por ejemplo incorporaciones de fluoruro (F-apatita), de cloruro (Cl-apatita) y de carbonato), el fosfato dicálcico ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), el fosfato de calcio dibásico (CaHPO_4), el fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO})_2$), fosfato octacálcico, fosfato tricálcico con substitutos de magnesio y algunas fases amorfas de fosfato de calcio. Además existen otros iones como citrato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{4-}$), carbonato (CO_3^{2-}), hidroxilo (OH^-), fluoruro (F^-), y algunas impurezas como magnesio, sodio, hierro y cloro (Bhat, 2005; Campa J. et al., 2007; LeGeros et al., 2009).

Los tejidos dentales están compuestos por tres tejidos especializados: el esmalte que contiene una fase inorgánica que abarca alrededor del 97% de peso su peso total, un 1% de una fase orgánica y un 2% de agua; la dentina que contiene una fase inorgánica que ocupa

alrededor del 70% de su peso, un 20% de una fase orgánica y un 10% de agua; y el cemento que contiene una fase inorgánica que abarca del 46% al 50% de peso total, un 22% de una fase orgánica y un 32% de agua. Dentro de la fase inorgánica de los tejidos dentales especializados, la hidroxiapatita carbonatada es el componente mayoritario (Campa J. et al., 2007; Fitzgerald et al., 2004; Mooney y Barrancos, 2006; Ross y Pawlina, 2008).

La hidroxiapatita sintética es una biocerámica de uso común ya que prácticamente tiene la misma composición que los tejidos óseos y dentales (Thian et al., 2006; Yang et al., 2011). Las principales diferencias entre la hidroxiapatita sintética y la hidroxiapatita biológica son los índices de cristalinidad, los contenidos de calcio y fósforo y las relaciones atómicas Ca/P. Los tejidos óseos presentan hidroxiapatita con una cristalinidad promedio de 33-37%, un porcentaje en peso de 35.5% de calcio y 17.1% de fósforo, y una relación atómica Ca/P de 1.71. El esmalte dental presenta hidroxiapatita con un índice de cristalinidad de 70-75%, un porcentaje en peso de 36.1% y 17.3% de fósforo, y una relación atómica Ca/P de 1.62. La dentina presenta hidroxiapatita con un índice de cristalinidad de 33-37%, un porcentaje en peso de 35.5% de calcio y 17.1% de fósforo, y una relación atómica Ca/P de 1.59. Las variaciones en los contenidos de calcio y fósforo en la hidroxiapatita biológica se deben a que la estructura presenta sustituciones iónicas e impurificaciones mínimas de distintos iones. En cambio, la hidroxiapatita sintética tiene un índice de cristalinidad del 80-100%, tiene un porcentaje en peso de 39% de calcio y 18.5% de fósforo, y una relación atómica de 1.667 (Campa J. et al., 2007; LeGeros et al., 2009; Uddin, Matsumoto, Okazaki et al., 2010).

II.4.1 Estructura de la hidroxiapatita

La hidroxiapatita es una cerámica perteneciente a la familia de las apatitas, cuya fórmula general es $A_{10}(BO_4)_6X_2$ (Tabla VI). Esta familia se distingue por tener un sistema hexagonal y un grupo espacial $P6_3/m$ a pesar de su amplia gama de composiciones (Bronzino, 2000; Demirkiran et al., 2010; LeGeros et al., 2009).

Tabla VI. Características de la hidroxiapatita sintética (LeGeros et al., 2009).

Peso molecular:	1004.6206 g/mol
Familia mineral:	Apatita
Sistema cristalino:	Hexagonal
Grupo espacial:	P ₆ ₃ /m
Dimensiones de la celda unitaria:	a = b = 9.432 Å y c = 6.881 Å
Relación Ca/P:	10:6

La estructura de la hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, puede reescribirse como: $\text{Ca(I)}_4\text{Ca(II)}_6(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Donde se utiliza la notación calcio tipo I Ca(I) y calcio tipo II Ca(II) para indicar los distintos tipos de posiciones que los átomos de calcio ocupan la estructura. La división se relaciona con el número diferente de átomos de oxígeno que se encuentran rodeando a los átomos de calcio de la molécula. En la estructura el Ca(I) se encuentra rodeado por nueve átomos de oxígeno, y el Ca(II) se encuentra rodeado por seis y un grupo OH^- . Por otra parte, el fósforo se encuentra rodeado por cuatro átomos de oxígeno y forma una tetraedro que es representativo del grupo fosfato (PO_4^{3-}). Finalmente, los grupos OH^- tienen una densidad de carga con simetría casi esférica (Bronzino et al., 2000; Campa J. et al., 2007; Graeve et al., 2010; LeGeros et al., 2009).

La unidad de construcción más simple que contiene una representación completa de la distribución de los átomos de la estructura cristalina de la hidroxiapatita se denomina celda unitaria. Las dimensiones de la celda unitaria de la hidroxiapatita son a = 9.432 Å y c = 6.881 Å, y contiene un arreglo de diez átomos de calcio (Ca^{2+}), seis grupos fosfato (PO_4^{3-}) y dos grupos hidroxilo (OH^-) (Figura 11). La celda unitaria representa la porción más simple del cristal y al repetirse se obtiene la estructura cristalina hexagonal de la apatita (Bronzino et al., 2000; LeGeros et al., 2009).

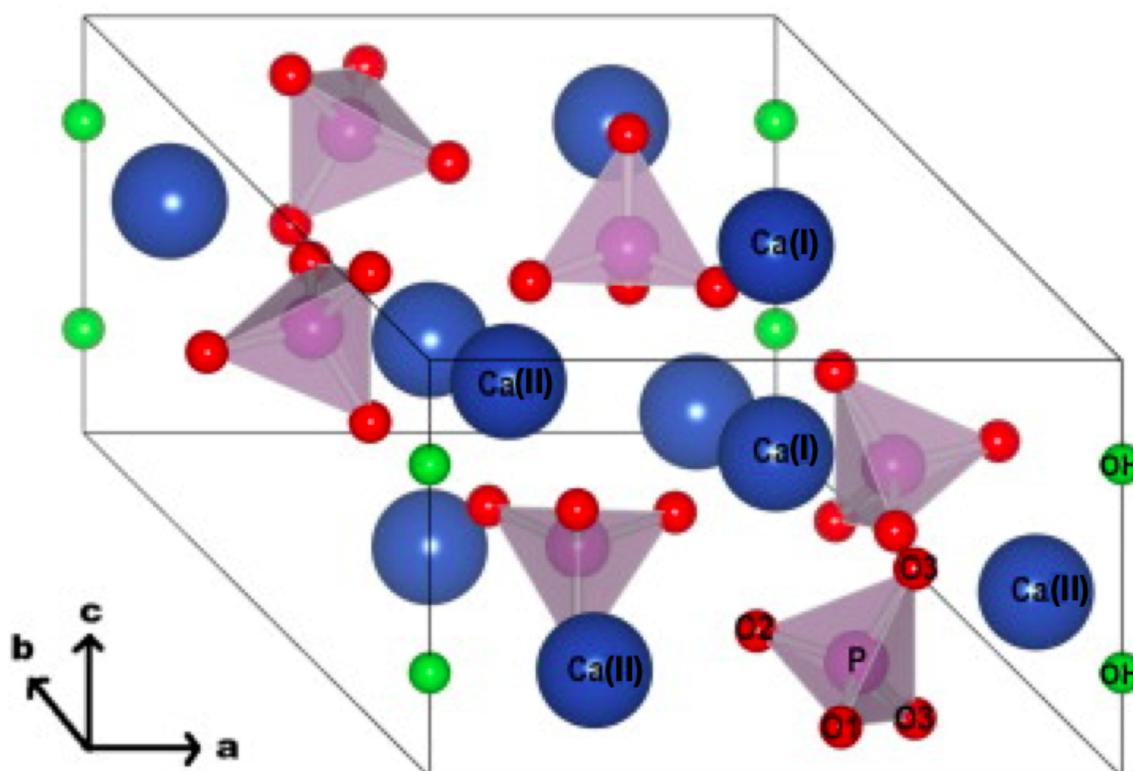


Figura 11. Celda unitaria de la hidroxiapatita. Mostrando los átomos de calcio tipo I (Ca(I)) y los de calcio tipo II (Ca(II)) en color azul, los átomos de fósforo rodeados por cuatro átomos de oxígeno (color rojo) formando el tetraedro representativo del grupo fosfato en color morado claro y los grupos hidroxilo en color verde (Pavan et al., 2012).

Dentro de la estructura hexagonal de la hidroxiapatita los Ca(II) se ubican un poco desplazados del centro del hexágono, los grupos OH⁻ presentan cierta movilidad debido a que interactúan con las cargas de los átomos de oxígeno y de los calcio tipo II. Los Ca(I) forman prismas trigonales triapuntados con los átomos de oxígeno que los rodean y se encuentran en las esquinas de la estructura hexagonal. Los tetraedros PO₄³⁻ se colocan de tal manera que quedan entre los dos tipos de calcio en la estructura. El arreglo hexagonal de la hidroxiapatita se puede observar en Figura 12 (Campa J. et al., 2007; LeGeros et al., 2009).

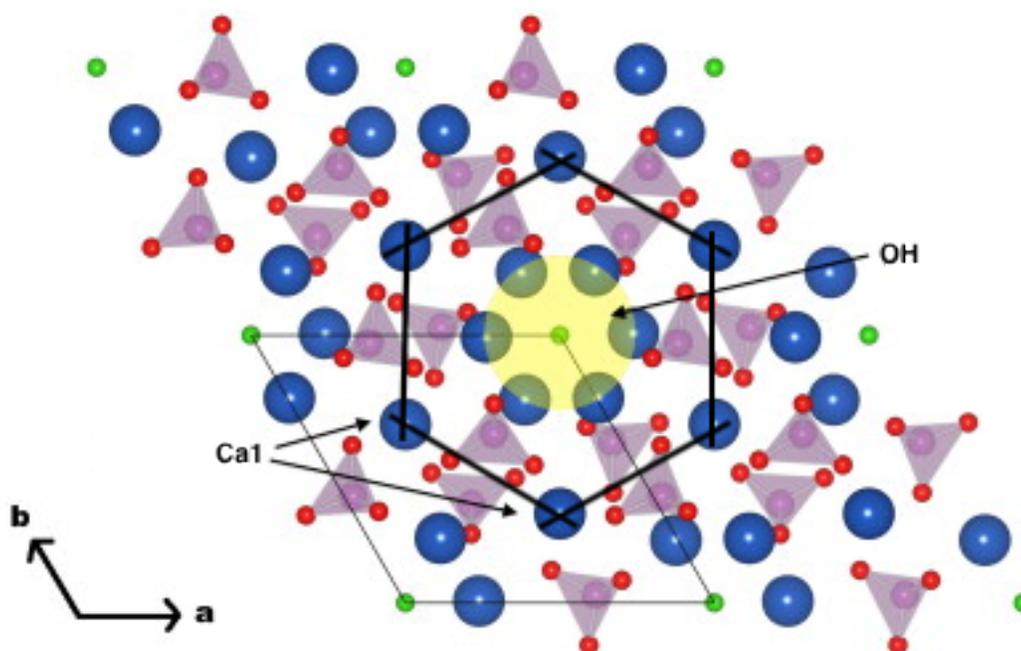


Figura 12. Cuatro celdas unitarias adyacentes representado la estructura hexagonal de la hidroxiapatita a lo largo del eje c. Ca^{2+} = azul, OH^- = verde, O = rojo, PO_4^{3-} = morado (Pavan et al., 2012).

La $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ es una estructura muy estable y flexible ya que permite la sustitución de los iones Ca^{2+} , P^{5+} , o los grupos OH^- que la componen por diversos iones. Por ejemplo, los iones Ca^{2+} que tienen un radio iónico de 1.12 Å pueden ser substituidos por iones univalentes o trivalentes como el Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+} , Eu^{3+} , Dy^{3+} , Y^{3+} , La^{3+} , Na^{1+} , y el K^{1+} . La sustitución de calcio se da preferentemente en los Ca(II) ya que tienen un menor número de coordinación que los Ca(I). Los P^{5+} pueden ser substituidos por iones tetravalentes o hexavalentes como el V^{5+} , As^{5+} , Si^{4+} , Ge^{4+} , S^{6+} , Cr^{6+} , y los grupos OH^- pueden ser substituidos por aniones como el F^- , Cl^- , Br^- , I^- , $(\text{CO}_3)^{2-}$, y O^{2-} (Ardanova et al., 2010; Balamurugan et al., 2009; Z. Y. Li et al., 2007; Ouenzer y Piriou, 1999; Silva et al., 2008). Las substituciones iónicas tienen como consecuencia la adquisición de nuevas propiedades; por ejemplo: propiedades luminiscentes, catalíticas o antibacteriales. También producen cambios en la cristalografía y en las propiedades fisicoquímicas de la

hidroxiapatita; por ejemplo, cambios en los arreglos de la red cristalina, las propiedades espectrales, color, morfología, solubilidad o la estabilidad térmica. El grado en los cambios de la estructura son proporcionales al tamaño y la concentración de los iones sustituyentes, y la adquisición de nuevas propiedades vienen dadas directamente por los de tipos iones utilizados para sustitución. Aunque las sustituciones iónicas son comunes en las hidroxiapatita biológica, la sustituciones de los iones en la hidroxiapatita sintética presentan diferentes respuestas de las células *in vitro* (Ardanova et al., 2010; Ciobanu, Massuyeau, Constantin, y Predoi, 2011; LeGeros et al., 2009; Z. Y. Li et al., 2007; Uddin et al., 2010).

II.4.2 Propiedades de la hidroxiapatita

La HAp es una biocerámica absolutamente biocompatible con los tejidos vivos. Es bioactiva dado que tiene la capacidad de tener interacciones específicas con los tejidos del cuerpo, es osteoconductiva ya que promueve la generación de nuevo tejido de manera direccionada, es muy estable en medios fisiológicos, permite la adhesión celular, es insoluble, tiene la capacidad de unirse al tejido óseo. Presenta una alta porosidad que permite el crecimiento de hueso dentro y a través de la estructura, no presenta toxicidad, y no presenta propiedades inflamatorias (Ardanova et al., 2010; Graeve et al., 2010; Hou et al., 2009; Kuriakose et al., 2004; H. Liu et al., 2011; Silva et al., 2008; Thian et al., 2006; Wei Wang et al., 2006; P. Yang et al., 2011; C. Zhang et al., 2009).

II.4.3 Aplicaciones de la hidroxiapatita

La hidroxiapatita es el compuesto más importante de los fosfatos de calcio que conforman la fase inorgánica de tejidos óseos y dentales. Debido a esto, la mayoría de las aplicaciones del material tienen como objetivo reemplazar de manera parcial o total los tejidos óseos o dentales del cuerpo humano.

La HAp es una biocerámica utilizada comúnmente como material de relleno óseo, material de recubrimiento para prótesis metálicas, material para reconstrucciones ortopédicas y dentales, andamio para el crecimiento de tejidos, sustituto total de hueso en áreas que no se someten a altas presiones, prótesis ortopédicas y dentales, y dispositivos liberadores de medicamento (Ardanova et al., 2010; E. J. D. Bronzino et al., 2000; Demirkiran et al., 2010; Fitzgerald et al., 2004; He, Kjellin, Currie, y Handa, 2011; Hench, 1991; Silva et al., 2008).

Además, la hidroxiapatita es utilizada para absorber componentes tóxicos (absorción de iones de cloro, flúor, paladio, cobre, cadmio, uranio, plutonio, arsénico, selenio, etc.) de aguas contaminadas y para la absorción de gases. Asimismo, la hidroxiapatita y la hidroxiapatita impurificada con diversos iones son aplicadas como sensores, materiales luminiscentes, materiales para laser, y agentes catalíticos (Ardanova et al., 2010). Otras aplicaciones de la hidroxiapatita son la utilización para la separación y purificación de proteínas y ácidos nucleicos mediante cromatografía (Ardanova et al., 2010; Voet et al., 2007).

II.4.4 Hidroxiapatita impurificada con disprosio como una plataforma ideal para el desarrollo de teranósticos

La hidroxiapatita impurificada con disprosio es un material idóneo para ser utilizado como una plataforma para el desarrollo de teranósticos. Debido a que la hidroxiapatita es un material altamente biocompatible y bioactivo, presenta una alta porosidad que puede ser utilizada para introducir algún agente activo y transportarlo intactamente hasta su blanco, tiene una alta superficie específica y grupos OH^- que pueden ser utilizadas para funcionalizar ligandos específicos, terapéuticos o agentes de contraste (Hou et al., 2009; Huang et al., 2011; H. Liu et al., 2011; P. Yang et al., 2008). La hidroxiapatita es una molécula muy estable y flexible ya que los componentes de la estructura son altamente sustituibles, lo que permite la inserción de diversos iones y la obtención de nuevas

propiedades (Ardanova et al., 2010; Balamurugan et al., 2009; Z. Y. Li et al., 2007; Ouenzer y Piriou, 1999). Además, la hidroxiapatita es un material que actualmente ya tiene diversas aplicaciones en ciencias médicas (Ardanova et al., 2010; Bronzino et al., 2000; Demirkiran et al., 2010; Fitzgerald et al., 2004; He et al., 2011; Hench, 1991; Silva et al., 2008).

Por su parte, el disprosio tiene propiedades luminiscentes y magnéticas, es un ión trivalente que se puede introducir fácilmente en la estructura de la apatita dado que presenta un radio iónico similar al del calcio de la estructura pero con una densidad de carga mayor (Ardanova et al., 2010; Mohammad Reza Ganjali et al., 2012). El disprosio es un agente de contraste utilizado comúnmente en sistemas de imagen médica como tomografía computarizada y resonancia magnética. (M R Ganjali, Zare-Dorabei, y Norouzi, 2009; Kattel et al., 2012; Ortega et al., 2004). Asimismo, el uso de disprosio como ión activador para la sustitución de los iones de calcio exhiben ventajas como una alta eficiencia en la luminiscencia, estabilidad térmica y química, baja energía de resonancia, una larga emisión, y una baja toxicidad (Gai et al., 2011; Hou et al., 2011; Nam et al., 2012).

Las nanopartículas de HAp:Dy³⁺ representan un material que combina las propiedades de la hidroxiapatita y del disprosio, lo que lo hace un candidato ideal para ser utilizado como un sistema capaz de diagnosticar, aplicar una terapia dirigida y monitorizar la respuesta a un tratamiento. Asimismo la hidroxiapatita con diferentes morfologías y propiedades es investigada como una plataforma para ser utilizada como un teranóstico (Hou et al., 2009; H. Liu et al., 2011; P. Yang et al., 2008, 2011).

II.5 Fluidos corporales

Aproximadamente el 72% del peso del cuerpo humano está constituido por agua. En el caso de los hombres es alrededor del 62% del peso corporal, en las mujeres el 52% y en infantes el 72%. Las mujeres tienen menos proporción de agua en el cuerpo debido a que ellas presentan más tejido adiposo que los hombres (Sircar, 2008).

En un hombre adulto de buena salud con un peso de 60 kg, el volumen total de agua en el cuerpo es de alrededor de 32 L que se distribuyen de manera no uniforme en los fluidos corporales. De los 32 L, 24 L conforman los fluidos intracelulares que son los que contienen las células y constituyen su medio interno, 12 L conforman los fluidos extracelulares y son aquéllos que se encuentran fuera de las células. Tres de los 12 L están presentes dentro de las válvulas sanguíneas como fluidos intravasculares. Los nueve litros restantes son llamados fluidos extravasculares; éstos se dividen en dos, una quinta parte lo conforman el plasma que se encuentra alrededor de las células como un fluido intersticial, que es separado solamente por las paredes de las válvulas sanguíneas de los fluidos intravasculares. Los otros cuatro quintos de los nueve litros están conformados por los fluidos transcelulares que se encuentran en compartimientos especializados. Por ejemplo, los fluidos cerebro espinales, los fluidos intraoculares, las secreciones gastrointestinales y la orina (Fuentes et al., 1998b; Sircar, 2008).

II.5.1 Agua

El agua es la sustancia incolora, inodora e insípida más abundante en los seres vivos. Como se mencionó anteriormente, constituye aproximadamente el 72% del peso total del cuerpo humano. El contenido suele mantenerse constante en el organismo pero existe gran variabilidad en la proporción dependiendo del tejido, su estado fisiológico y la actividad. En tejidos más jóvenes y con una alta actividad, el contenido de agua es mayor que en los tejidos de mayor edad y con menor actividad (Teijón y Garrido, 2006). El agua es una

sustancia muy reactiva y sus propiedades físicas y químicas son de gran importancia para las estructuras y funciones de las moléculas del organismo.

La molécula de H₂O presenta enlaces covalentes entre los átomos de oxígeno e hidrógeno (O-H), con una distancia de enlace de 0.958 Å (1 Å = 10⁻¹⁰ m) y con un ángulo de 104.5 ° formado entre los tres elementos. Se ordena en el espacio en forma de un tetraedro irregular, donde el átomo de oxígeno está ubicado en el centro y los átomos de hidrógeno dirigidos hacia los vértices del tetraedro dando como resultado una molécula con distribución de cargas asimétricas (Voet et al., 2007).

La molécula de agua es una estructura eléctricamente polar: el átomo de oxígeno con sus electrones no apareados presenta una carga parcial negativa y los dos átomos de hidrógeno presentan una carga parcial positiva. Las atracciones electrostáticas entre los dipolos de las moléculas de agua son fundamentales en las reacciones bioquímicas del cuerpo (Voet et al., 2007). Las orientaciones de las moléculas de agua forma puentes de hidrógenos entre éstas, lo que permite mantenerlas unidas, esto se puede observar en la Figura 13 (Berg, Tymoczko, y Stryer, 2007).

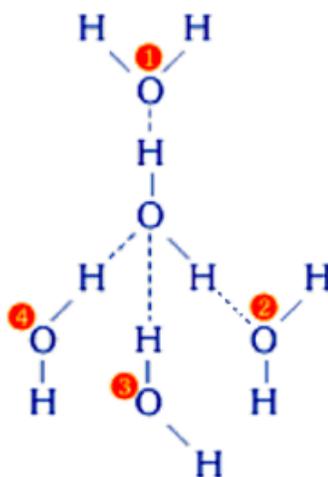


Figura 13. Cuatro moléculas de agua ordenadas en el espacio en forma de tetraedro y unidas entre sí por puentes de hidrógeno (señalados con puntos) (Teijón y Garrido, 2006).

Cada molécula de agua puede unirse a otras cuatro moléculas mediante puentes de hidrógeno, lo que produce una cohesión interna y es la base de sus propiedades de tanto interés biológico. Dentro de las propiedades que juegan un papel fundamental en el cuerpo humano se encuentran: el tener un elevado calor específico, lo que permite que los puentes de hidrógeno se rompan lentamente produciendo en el organismo una estabilización en la temperatura, tener un elevado calor de vaporización, lo que proporciona al cuerpo la capacidad de mantener una temperatura más baja que la del ambiente cuando hace calor; tener una elevada conductividad térmica que facilita al cuerpo mantener una temperatura igualitaria en todas las partes del cuerpo, y finalmente contar con una elevada tensión superficial, lo que posibilita la ósmosis entre las células permitiendo el intercambio de fluidos entre los tejidos (Teijón y Garrido, 2006; Voet et al., 2007). Además, el agua es un disolvente muy versátil permitiéndole disolver compuestos iónicos, compuestos polares y solubilizar compuestos de carácter lipídico (Berg et al., 2007).

II.5.2 Orina

Los riñones son los órganos encargados de mantener constantes las características fisicoquímicas de los fluidos internos del cuerpo humano. La formación de orina se realiza mediante el ultra filtrado del plasma sanguíneo por medio de los riñones. En este proceso se lleva a cabo la reabsorción de agua y sustancias esenciales filtradas para el funcionamiento del cuerpo, donde en promedio 170 000 ml de plasma filtrado son transformados en 1 200 ml de orina en un día. La orina es utilizada como una herramienta base para el diagnóstico del cuerpo humano (Coté et al., 2008; Strasinger y Schaub, 2010).

La orina está compuesta de urea y otras sustancias químicas tanto orgánicas como inorgánicas disueltas en agua. Contiene 95% de agua y 5% de solutos, esta concentración de solutos suele variar dependiendo de factores como la alimentación, la actividad física, el metabolismo corporal, el clima, las funciones endocrinas, entre otros. La urea es el producto de desecho producido en el hígado por la actividad catabólica de proteínas y

aminoácidos. El color de la orina es amarillo, su reacción es ácida y su sabor salado (Strasinger y Schaub, 2010). La composición de la orina se puede observar en Tabla VII .

Tabla VII. Composición de la orina recolectada en 24 h (Strasinger y Schaub, 2010).

Componente	Cantidad	Comentario
Orgánico		
Urea	25-35 g	60-90% de material nitrogenado; derivados del metabolismo de los aminoácidos en amoniaco
Creatinina	1.5 g	Derivado de la creatina, sustancia nitrogenada en el tejido muscular
Ácido úrico	0.4-1 g	Componente común de los cálculos renales, derivados del catabolismo de los ácidos nucleicos en los alimentos y la destrucción celular
Ácido hipúrico	0.7 g	El ácido benzoico se elimina de cuerpo en esta forma, aumenta con dietas de alto contenido de vegetales
Otras sustancias	2.9 g	Hidratos de carbono, pigmentos, ácidos grasos, enzimas, hormonas; pueden estar presentes en pequeñas cantidades en función de la dieta y el estado de salud
Inorgánico		
NaCl	15 g	Sal principal; varía con el aporte dietético
K ⁺	3.3 g	Aparece como cloruro, sulfato y sales de fosfato
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	2.5 g	Derivados de aminoácidos
PO ₄ ³⁻	0.7 g	Se produce en general como compuestos de sodio que actúan como solución amortiguadora en la sangre
Amonio (NH ₄ ⁺)	0.7 g	Procedente de las proteínas y del metabolismo de la glutamina en los riñones; la cantidad varía en función de la sangre y de la acidez del líquido del tejido
Mg ²⁺	0.1 g	Aparece como cloruro, sulfato y sales de fosfato
Ca ²⁺	0.3 g	Aparece como cloruro, sulfato y sales de fosfato

II.5.3 Suero

La sangre es el medio de transporte más importante del organismo. En un hombre adulto tiene un volumen aproximado de 6 L que equivale en promedio del 7% al 8% de peso corporal. La sangre mantiene la homeostasis del cuerpo, transporta y distribuye desde

sustancias nutritivas, oxígeno, células, hormonas, sustancias reguladoras y agentes humorales hasta desechos, restos celulares y dióxido de carbono (Ross y Pawlina, 2008).

La sangre tiene una composición general de células sanguíneas (eritrocitos, leucocitos y trombocitos) y sus derivados y el plasma sanguíneo rico en proteínas. El volumen relativo de células sanguíneas es del 45% y del plasma 55% (Koolman y Röhm, 2004).

El plasma sanguíneo es un líquido claro y ligeramente amarillento compuesto en más del 90% de agua, alrededor del 7% de proteínas y 1% de otros solutos (Tabla VIII). Las proteínas plasmáticas son principalmente albúmina, globulinas y fibrinógeno, pero existen otras en menores cantidades. La albúmina es la proteína más abundante del plasma y constituye del 54-58% de las proteínas totales. Su función general es el transporte de la tiroxina y de la triyodotironina, la conservación de la presión osmótica, el transporte de ácidos grasos, bilirrubina, ácidos biliares, hormonas esteroideas, iones inorgánicos, y fármacos (Koolman y Röhm, 2004; Ross y Pawlina, 2008; Teijón y Garrido, 2006).

Tabla VIII. Composición del plasma sanguíneo (Ross y Pawlina, 2008).

Componente	%
Agua	91-92
Proteínas (albúmina, globulinas, fibrinógeno)	7-8
Otros solutos:	1-2
- Electrolitos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-})	
- Sustancias nitrogenadas no proteicas (urea, ácido úrico, creatina, creatinina, sales de amonio)	
- Sustancias nutritivas (glucosa, lípidos, aminoácidos)	
- Gases sanguíneos (oxígeno, dióxido de carbono, nitrógeno)	
- Sustancias reguladoras (hormonas, enzimas)	

Las globulinas comprenden a las inmunoglobulinas (en mayor concentración) y a las globulinas no inmunes. Sus funciones son servir como protección, transporte de iones y agentes de coagulación. El fibrinógeno es la proteína más grande dentro del plasma y tiene como función ser un factor de coagulación que se convierte en fibrina por la acción de otras proteínas contenidas en el plasma sanguíneo (Ross y Pawlina, 2008).

El suero tiene la misma composición que el plasma sanguíneo excepto que éste carece de los factores de coagulación (fibrinógeno y otros factores). El suero es obtenido después de separar los factores de coagulación, regularmente mediante centrifugación (Koolman y Röhm, 2004; Ross y Pawlina, 2008).

II.6 Proteínas

Las proteínas son polímeros orgánicos lineales que desempeñan una amplia variedad de funciones vitales. La diversidad de los papeles que juegan las proteínas en el organismo se pueden clasificar de manera general en funciones: de estructura, de transporte, de protección y defensa, de control y regulación, de catálisis, de comunicación, de almacenamiento, de movimiento, y muchas otras especializadas (Alberts et al., 2006; Voet et al., 2007).

Las proteínas se ensamblan a partir de un grupo de 20 L-aminoácidos, cada uno con diferentes propiedades químicas, que son definidas por las cadenas laterales de cada aminoácido. Un L-aminoácido tiene una estructura general mostrada en la Figura 14 y consiste en un átomo de carbono central, llamado carbono α , unido a un grupo amino ($-NH_2$), un grupo carboxilo ($-COOH$), un átomo de hidrógeno y un grupo R (cadena lateral) que es diferente en cada aminoácido (Berg et al., 2007; Teijón y Garrido, 2006).

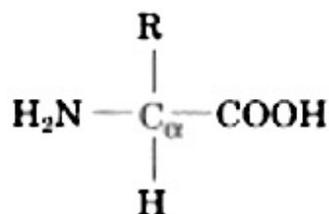


Figura 14. Estructura general de los aminoácidos (Voet et al., 2007).

Los L-aminoácidos se ensamblan unos con otros a través del enlace peptídico. Un enlace peptídico es una reacción de condensación covalente que se forma cuando el átomo de carbono del grupo carboxilo desprotonado (disociado) ($-\text{COO}^-$) de un aminoácido comparte electrones con el átomo de nitrógeno de un grupo amino protonado ($-\text{NH}_3^+$) de otro aminoácido (Figura 15) (Alberts et al., 2006; Berg et al., 2007).

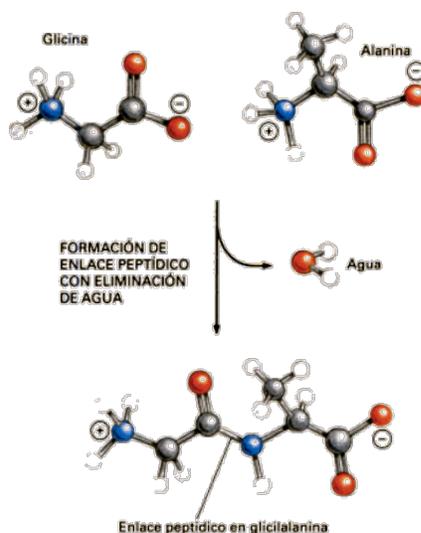


Figura 15. Ensamble de dos aminoácidos mediante el enlace peptídico (Alberts et al., 2006).

Cada proteína difiere en su secuencia de aminoácidos, de manera que la posición secuencial de las cadenas laterales le confiere sus propiedades individuales y la conformación estructural que adopta. Las proteínas se pliegan en conformaciones únicas y de menor energía, estas conformaciones se mantienen estables mediante puentes de hidrógeno, enlaces iónicos y fuerzas de Van der Waals. Lo que les permite tener complejos niveles de organización (Figura 16) (Alberts et al., 2006).

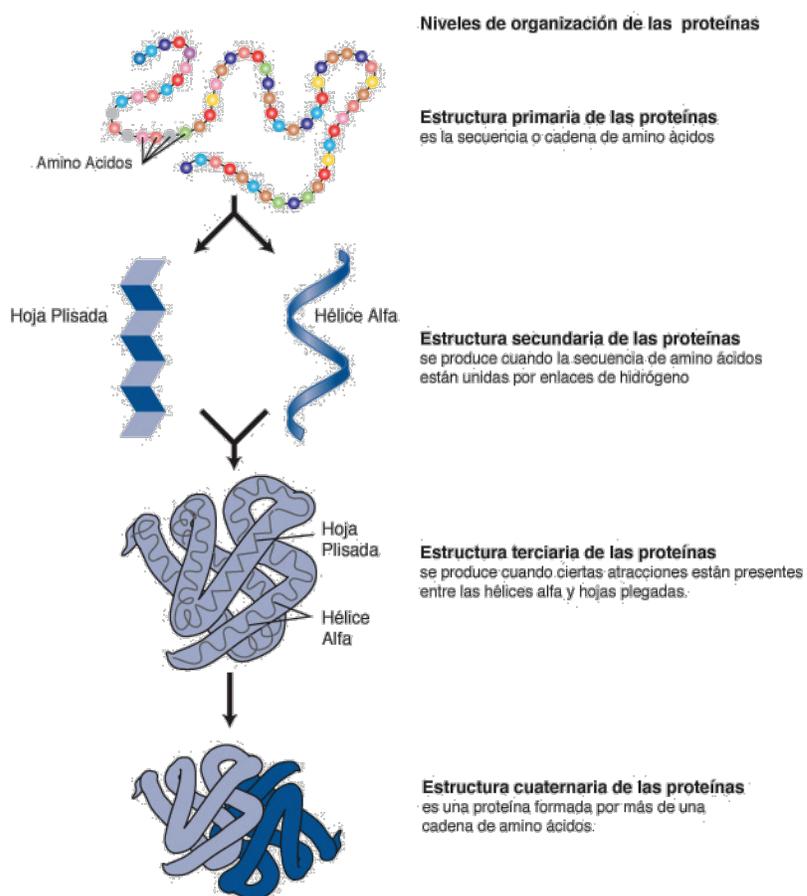


Figura 16. Estructuras conformacionales de las proteínas (Witherly, 2012).

II.6.1 Albúmina sérica

La albúmina sérica es una proteína que tiene una masa molecular de alrededor de 66 kDa, su síntesis es llevada a cabo en el hígado, presenta una alta solubilidad en agua, y tiene un punto isoeléctrico de 4.8 lo que le confiere un carácter ácido. La estructura primaria de la proteína está constituida por una cadena polipeptídica de 582 aminoácidos, que carece de carbohidratos (no está glucosilada). De los 582 aminoácidos que conforman la estructura, destacan 60 lisinas (Lys) que mediante los grupos amino protonables (-NH₂) de sus cadenas laterales le permiten unirse a otras proteínas y péptidos. También notorios son los 41 residuos de ácido aspártico (Asp) y los 58 de ácido glutámico (Glu), que mediante los grupos carboxilo disociables (-COOH) de sus cadenas laterales le permiten unirse a diferentes proteínas y péptidos, así como a ligandos. Asimismo, destacan los 35 residuos de cisteína (Cys) que le permiten formar 17 puentes de disulfuro (Koolman y Röhm, 2004; Misra et al., 2010; Ross y Pawlina, 2008; Teijón y Garrido, 2006).

Tabla IX. Composición de aminoácidos de la albúmina sérica bovina (Bloomfield, 1966; Hirayama, Akashi et al., 1990).

Aminoácido	Cantidad	Aminoácido	Cantidad
Ala	48	Val	38
Phe	30	Asp	41
Lys	60	His	16
Pro	28	Met	5
Thr	34	Arg	26
Cys	35	Trp	3
Gly	17	Glu	58
Leu	65	Ile	15
Gln	21	Ser	32
Try	21	Asn	14

La conformación estructural única de la albúmina sérica está dada por los 17 puentes de disulfuro que contiene. De manera que su plegamiento forma 9 bucles agrupados en tres dominios homólogos de tres bucles cada uno (1-3, 4-6, 7-9) (Figura 17) (Peng et al., 2011). La albúmina sérica humana tiene una estructura secundaria constituida por un 55% de alfa hélice (α -hélice) y un 16% de hoja plegada (hoja- β) (Teijón y Garrido, 2006).

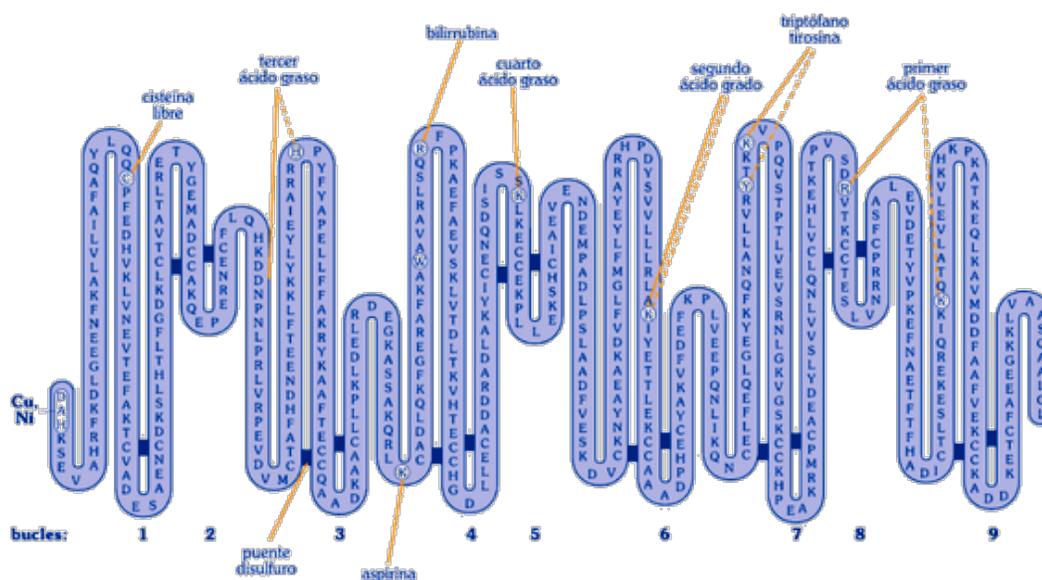


Figura 17. Esquema de la disposición en bucles de la albúmina y principales sitios de unión de los ligandos (Teijón y Garrido, 2006).

Como se mencionó anteriormente, la albúmina es la proteína más abundante del plasma sanguíneo y constituye del 54-58% de las proteínas totales. Es responsable de ejercer la presión sobre la pared de los vasos sanguíneos (presión coloidosmótica) manteniendo la proporción correcta de volumen sanguíneo con respecto al volumen del líquido intersticial. La albúmina también juega un rol importante en el almacenamiento y transporte de una gran cantidad de fármacos, hormonas, ácidos grasos y muchas otras moléculas bioactivas pequeñas (Koolman y Röhm, 2004; Ross y Pawlina, 2008).

III. Técnicas experimentales

III.1 Sol-gel

El proceso de sol-gel es un método de síntesis de materiales que permite obtener sólidos homogéneos de alta pureza a escala molecular mediante la preparación de una fase sol, la gelación del sol y la remoción del solvente utilizado (Brinker y Scherer, 1990; Liu, Troczynski, y Tseng, 2001). Sol-gel engloba una diversidad de técnicas que permite obtención de polvos cristalinos, polvos amorfos, monolitos, materiales recubiertos, fibras y películas (Figura 18).

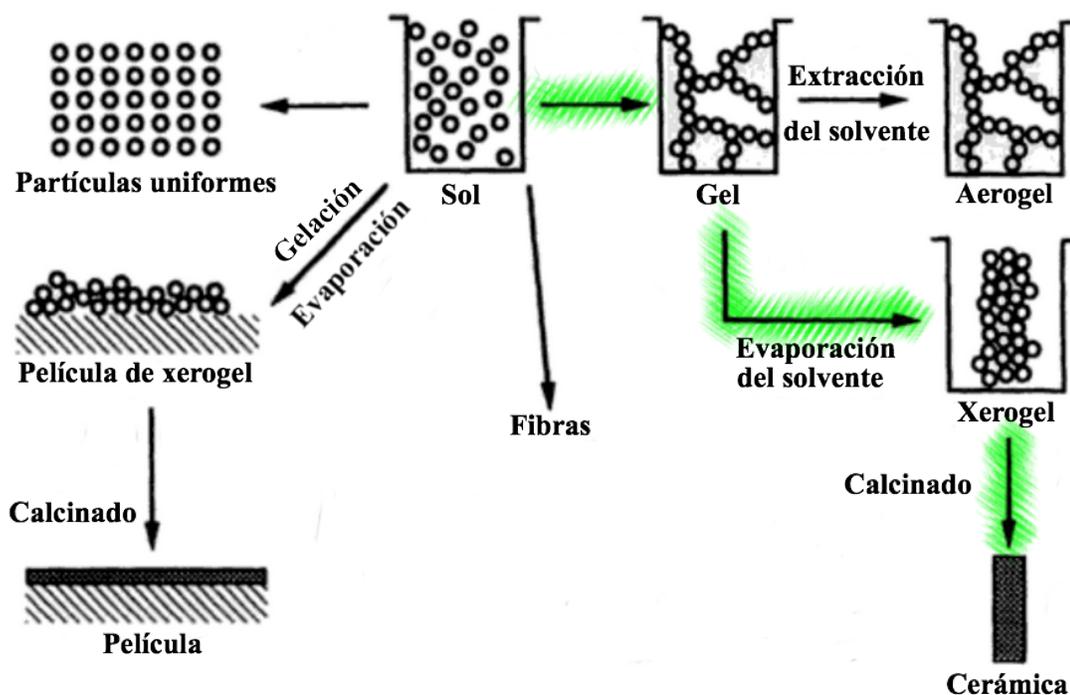


Figura 18. Esquema general del proceso sol-gel y su versatilidad de técnicas para la obtención de materiales. Se resalta en verde la ruta utilizada en esta investigación (Brinker y Scherer, 1990).

El proceso general de síntesis de materiales mediante las técnicas sol-gel consta de cinco fases: la primera fase consiste en la obtención de una solución de precursores, que se puede llevar a cabo por una ruta coloidal compuesta por sales metálicas en una solución acuosa o por una ruta metal-orgánica compuesta por alcóxidos metálicos en una solución ácida o básica (Steinfeldt, 2007).

Los alcóxidos metálicos son miembros de la familia de los compuestos metal-orgánicos y son los más utilizados en el proceso sol-gel. Los alcóxidos metálicos, como precursores, consisten en un elemento metálico o metaloide atrapado por varios ligandos (complejo metálico). Los ligandos más utilizados son los alquil formados a partir de la remoción de un hidrógeno de un alcano, y los alcoxi formados a partir de la remoción de un hidrógeno de un alcohol (Brinker y Scherer, 1990; Pierre, 1998). Asimismo, se han utilizados ácidos hidroxicarboxílicos como el cítrico ($C_6H_8O_7$) o el tartárico ($C_4H_6O_6$) para la formación de complejos estables (Figura 19) (Taxak, Khatkar, Han, Kumar, y Kumar, 2009).

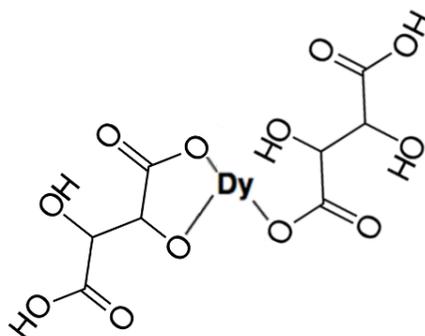


Figura 19. Ión disprosio atrapado por un par de moléculas de ácido tartárico. Los iones lantánidos trivalentes tienden a formar complejos estables con los ácidos hidroxicarboxílicos.

Una vez formados los complejos en la solución de precursores, la segunda fase consiste en la obtención de una suspensión coloidal estable de partículas sólidas en un líquido, llamada sol. Las partículas presentes en el sol tienen un tamaño de entre 1-1000 nm y se mantienen unidas por fuerzas débiles como fuerzas de Van der Waals y cargas

superficiales. En esta fase ocurre una hidrólisis y una condensación de la solución de precursores (Brinker y Scherer, 1990; Pierre, 1998).

La tercera fase consiste en la formación del gel mediante un proceso de gelación, en donde el sol sufre una policondensación y pasa de una fase viscosa y líquida a una fase sólida. El gel es una red sólida tridimensional y porosa que presenta residuos del disolvente entre sus poros. La conformación de gel depende de las interacciones de la red tridimensional con el solvente que mantiene atrapado en sus poros (Pierre, 1998).

En la cuarta fase, llamada envejecimiento del gel, ocurre una contracción en la red sólida e involucra procesos de condensación, disolución y reprecipitación (formación de un sólido a partir de un líquido). La fase de envejecimiento tiene fuertes efectos en la estructura y propiedades finales del material (Branda, 2011).

La quinta fase consiste en retirar el líquido contenido en los poros de la estructura del gel. Si este proceso se realiza mediante temperatura, la estructura obtenida se conoce como xerogel (Branda, 2011; Brinker y Scherer, 1990). Una vez obtenido el xerogel, éste se somete a un tratamiento térmico. Las condiciones del tratamiento térmico dependen de la aplicación final del material.

III.2 Difracción de rayos X

Las propiedades de un material sólido están determinadas por su estructura atómica y molecular. Un sólido cristalino es aquel en el cual los átomos, los iones y las moléculas que lo componen se acomodan de manera ordenada siguiendo un patrón tridimensional. Además presentan planos cristalinos (formados por capas de átomos) bien definidos, que forman ángulos definidos unos con otros. Por otro lado, un sólido amorfo presenta una estructura de manera desordenada y al azar (Figura 20) (Atkins y Jones, 2006; Cortes et al., 2006).

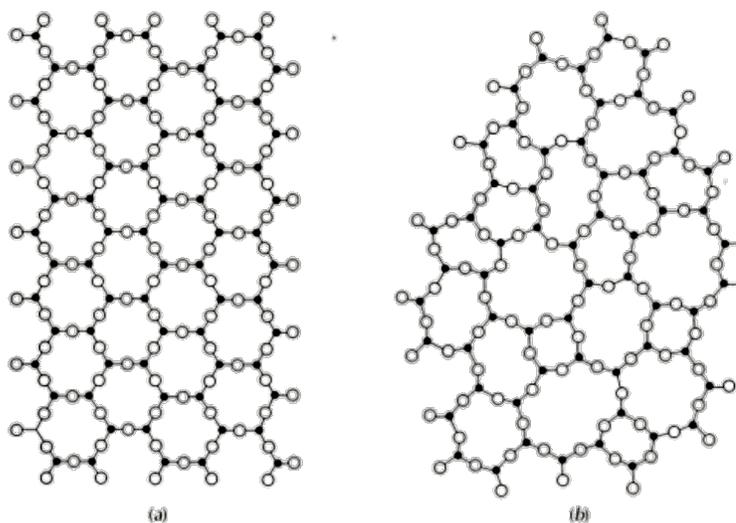


Figura 20. Representación esquemática bidimensional de (a) un sólido cristalino y (b) un sólido amorfo (Shriver, Atkins, y Langford, 2004).

La difracción de rayos X (XRD) es una técnica utilizada para determinar la disposición ordenada de los átomos y moléculas de una estructura cristalina. Permite conocer la distancia entre los átomos y sus ángulos de enlace, así como la determinación de la estructura cristalina mediante el análisis de los patrones de difracción obtenidos, que son característicos de cada material cristalino.

El proceso de difracción de rayos X consisten en la generación de un haz de rayos X con una longitud de onda del orden de 0.1 nm. El difractómetro cuenta con una serie de filtros que hacen al haz de rayos X colimado y monocromático (Atkins y Jones, 2006; Serway y Jewett, 2004; Skoog et al., 2008). El haz de rayos X se hace incidir sobre una muestra cristalina que tiene una separación entre sus átomos de alrededor de 0.1 nm. Esto produce que los rayos X se difracten y como consecuencia se generan fenómenos de interferencia en las ondas de los rayos X. Estas interferencias pueden ser de carácter constructivo que se presentan cuando los picos de una onda coinciden con otra, ocasionado

un aumento en la amplitud de la onda; o de carácter destructivo, que se presentan cuando los máximos de una onda coinciden con los valles de la otra, ocasionando una disminución en la amplitud de la onda. Las interferencias de carácter constructivo son registradas por un detector y de esta manera se genera un patrón de difracción característico del material cristalino analizado. (Figura 21) (Atkins y Jones, 2006; Serway y Jewett, 2004).

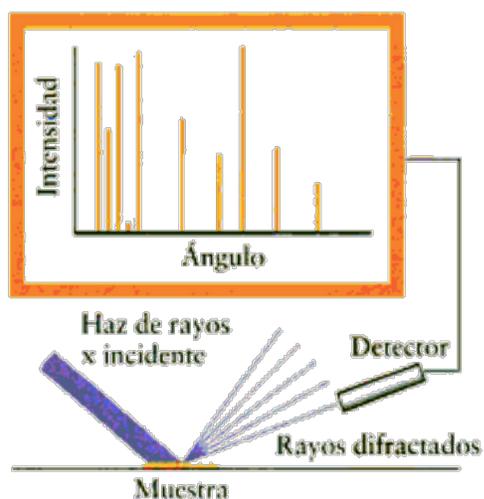


Figura 21. Esquema general de la obtención de los patrones de difracción de una estructura cristalina (Atkins y Jones, 2006).

Las interferencias constructivas están condicionadas por la ley de Bragg ($2d\sin\theta = n\lambda$). Esto se debe a que las capas de átomos de un cristal pueden reflejar los rayos del haz por una capa superior o una inferior. Teniendo en cuenta que los rayos X inferiores recorren una mayor distancia que los superiores, existe una diferencia entre ambas capas igual a $2d\sin\theta$, donde d es la distancia que existe entre las capas. La interferencia se cumple cuando la diferencia de camino es un múltiplo entero (n) de la longitud de onda (λ) del haz (Figura 22) (Serway y Jewett, 2004).

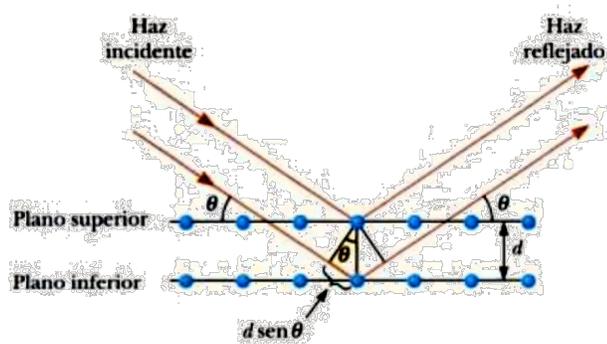


Figura 22. Descripción bidimensional de la reflexión de una haz de rayos X en dos planos paralelos de un cristal (Serway y Jewett, 2004).

La ley de Bragg es indispensable para llevar a cabo la caracterización de estructuras cristalinas. En este tipo de estudios, el patrón de difracción obtenido se compara con una base de datos de estructuras cristalinas a partir de polvos del Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD) (Atkins y Jones, 2006; Skoog et al., 2008).

III.3 Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una técnica con un principio similar al del microscopio óptico, con la diferencia de que en TEM se utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz (Ross y Pawlina, 2008).

La base del funcionamiento del TEM es un cañón de electrones. El haz de electrones se produce calentando un filamento de tungsteno (cátodo). Los electrones son atraídos hacia el ánodo generándose un haz de electrones debido a la diferencia de potencial entre el cátodo y el ánodo. Esta diferencia de potencial genera un voltaje de aceleración de entre 20 000 y 200 000 voltios. El haz de electrones es enfocado sobre un área determinada de la muestra utilizando un condensador electromagnético cuya función es dar forma al haz, cambiar su diámetro y dirigir el haz de electrones en línea recta con la finalidad de escanear la muestra,

cumpliendo la misma función que el condensador de luz en un microscopio óptico (Ross y Pawlina, 2008; Tortora et al., 2007).

La muestra regularmente es preparada sobre una rejilla de cobre, y posteriormente es montada en el microscopio que presenta una atmósfera de alto vacío para su funcionamiento. El haz de electrones condensado primero atraviesa la muestra que se encuentra en la rejilla, después es enfocado y aumentado por una lente objetivo, y finalmente el haz de electrones es enfocado y aumentado de nuevo por las lentes magnéticas proyectoras que despliegan la imagen sobre una pantalla fluorescente (Figura 23). La imagen obtenida se forma por la dispersión de los electrones que se impactan con el núcleo y los electrones de la muestra, de manera que se observan imágenes de formas claras para aquellas partes donde el haz ha atravesado la muestra y oscuras para las partes donde la muestra ha dispersado los electrones. La resolución del microscopio electrónico de transmisión permite observar objetos separados por una distancia de 2.5 nm y ampliarlos de 10 000 a 100 000 x (Ceccotti y Sforza, 2007; Ross y Pawlina, 2008; Tortora et al., 2007).

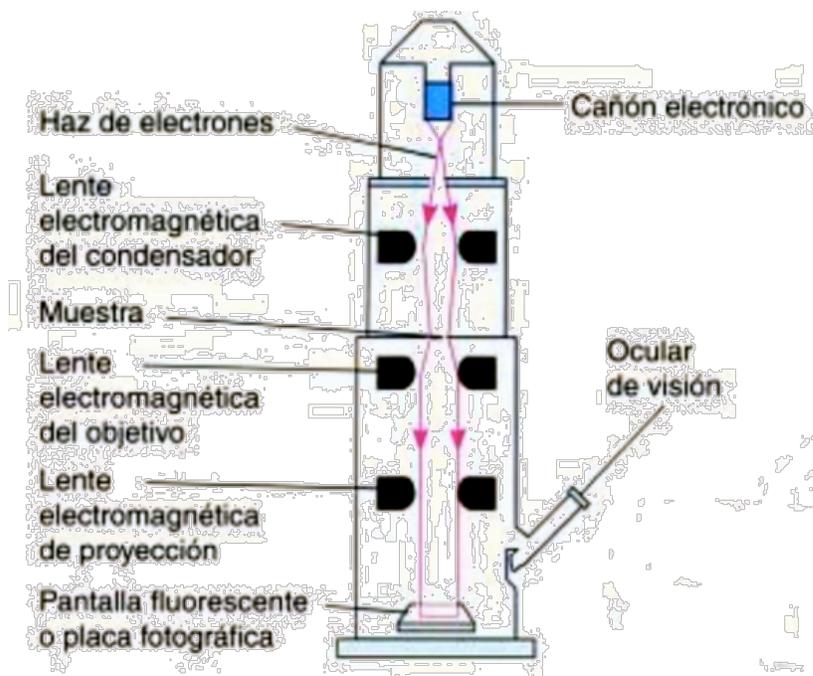


Figura 23. Microscopio electrónico de transmisión (Tortora et al., 2007).

III.4 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM) permite obtener información morfológica y topográfica de la superficie de la muestra. El microscopio electrónico de barrido genera un fino haz de electrones denominado haz primario, mediante un cañón de electrones. El haz primario atraviesa una serie de lentes electromagnéticas, que tienen como finalidad controlar la intensidad, el enfoque y los aumentos del haz (Ross y Pawlina, 2008; Tortora et al., 2007). Una vez que el haz de electrones de alta energía ha sido condensado por las lentes, éste realiza un barrido por la superficie de la muestra sin atravesarla. Los electrones que bombardearon la superficie de la muestra son retro-disparados (reflejados por la superficie) y los electrones superficiales de la muestra son expulsados (emitidos) de la superficie, generando un haz secundario. El haz secundario es colectado por uno o varios detectores, amplificado y reprocesado para producir una señal eléctrica que modula la intensidad del haz que forma una imagen de tipo tridimensional en un tubo de rayos catódicos (TCR) de alta resolución. El efecto tridimensional de la imagen se obtiene debido a que los electrones secundarios varían de dirección, dependiendo de los diferentes ángulos de incidencia que tiene el haz primario con la superficie de la muestra (Ceccotti y Sforza, 2007; Ross y Pawlina, 2008; Tortora et al., 2007). La imagen obtenida se puede observar directamente en la pantalla y registrarse en forma digital. La muestra también emite rayos X, por lo que se pueden usar otros detectores para medirlos y obtener información sobre la composición del material (Ross y Pawlina, 2008).

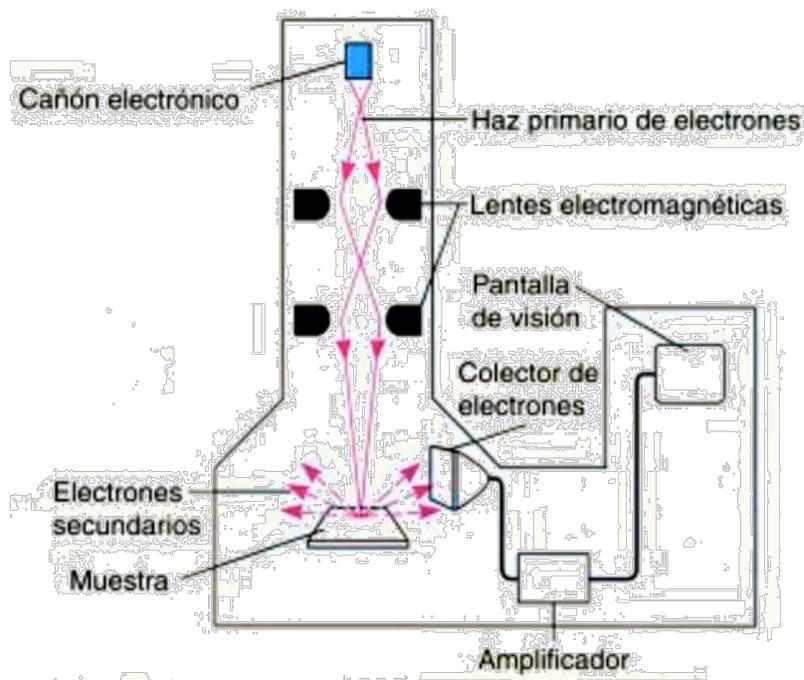


Figura 24. Microscopio electrónico de barrido (Tortora et al., 2007).

La resolución del microscopio electrónico de barrido permite definir objetos separados por una distancia de 20 nm y ampliarlos de 1 000 a 10 000 x. Además permite obtener una nitidez de profundidad en la muestra de hasta diez veces más que la que se obtiene con el microscopio óptico (Ceccotti y Sforza, 2007; Tortora et al., 2007).

III.5 Espectroscopía de dispersión de energía

La espectroscopía de dispersión de energía (EDS) es una técnica utilizada para conocer la composición elemental de una muestra de manera semicuantitativa.

El espectrómetro de dispersión de rayos X puede acoplarse al microscopio electrónico de barrido. Cuando el sistema se encuentra acoplado, el haz primario de alta energía, procedente de la fuente del microscopio, bombardea a la muestra y hace un barrido de la

superficie con lo que se generan electrones retro-disparados de los diferentes átomos que conforman la muestra (haz secundario) (Fernández, 2003; Vásquez y Echeverría, 2000).

Los electrones retro-disparados crean huecos en orbitales internos de los átomos, estas vacantes creadas son ocupadas por otros electrones de un orbital superior del mismo átomo que presenta la vacante. Como cada elemento tiene una estructura electrónica y un conjunto de orbitales únicos, la energía liberada por esta transición de orbital es única y de longitud de onda de los rayos X. Estos fotones presentan una intensidad de emisión baja y son detectados por un cristal semiconductor de manera electrónica. Los átomos del cristal se ionizan dependiendo de la cantidad de energía de cada fotón, lo que permite digitalizar el voltaje por cada fotón incidente y analizarlo mediante una computadora (Figura 25) (Cao, 2004; Vásquez y Echeverría, 2000).

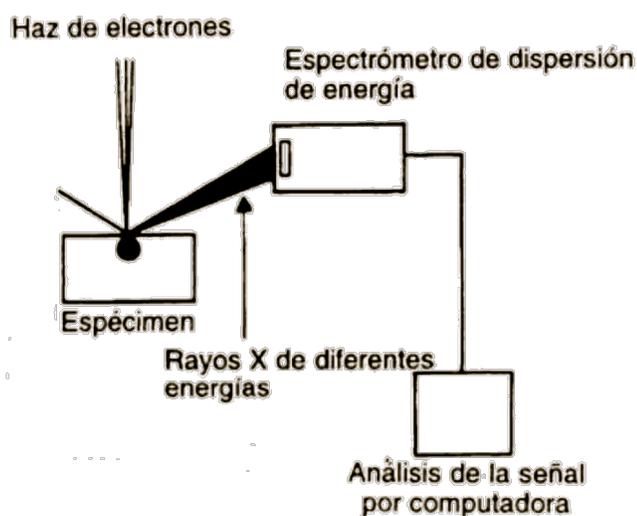


Figura 25. Esquema del espectroscopio de dispersión de rayos X acoplado al microscopio electrónico de barrido (Vásquez y Echeverría, 2000).

El espectroscopio de dispersión de rayos X reconoce las frecuencias de emisión de una gran variedad de energías, mide la transición, determina a que átomo corresponde y realiza

un gráfica de las cantidades relativas del átomo en una muestra (Vásquez y Echeverría, 2000).

III.6 Espectroscopía de fotoluminiscencia

La espectroscopía de fotoluminiscencia (PL) es una técnica que tiene como finalidad la evaluación analítica de las propiedades luminiscentes de un material, se basa en la emisión de luz de un material después de que éste ha sido excitado mediante un haz de radiación electromagnética. En el caso de la PL, la excitación se realiza con luz ultravioleta que abarca las longitudes de onda desde los 200 a los 400 nm del espectro electromagnético.

La excitación de los electrones ocurre desde el estado fundamental hasta varios niveles de energía superiores en el estado excitado. Cuando los electrones se relajan desde el estado electrónico excitado al estado fundamental, el exceso de energía se libera en forma de fotones. Si el tiempo de vida del estado excitado es de alrededor de 10^{-8} s, el proceso es llamado fluorescencia (Figura 26). En cambio, si la duración de vida del estado excitado es de más de 10^{-4} segundos hasta incluso días, la forma de emisión se denomina fosforescencia (Devlin, 2004; Fuentes et al., 1998a). En el proceso de fotoluminiscencia la emisión luminiscente es de menor energía que la excitación, esto se debe al equilibrio vibracional que ocurre durante la transición del estado fundamental al estado excitado. Por ejemplo, la fluorescencia en la región del visible se observa cuando la fuente de excitación es radiación ultravioleta (Fuentes et al., 1998a; Skoog et al., 2008).

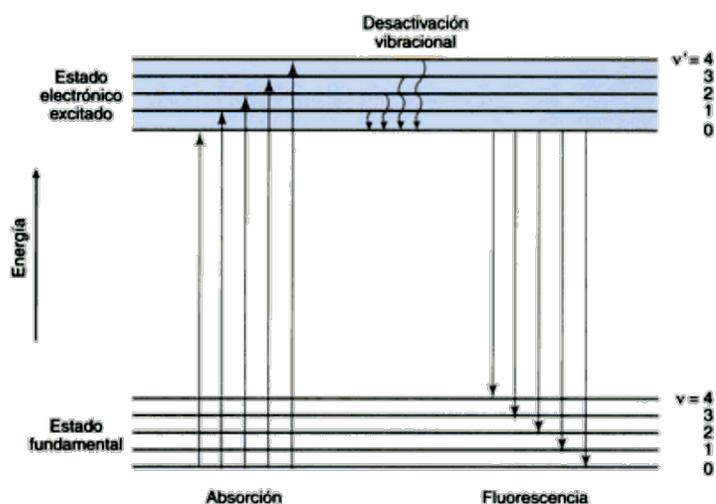


Figura 26. Transiciones electrónicas de absorción y fluorescencia (Devlin, 2004).

La evaluación analítica de las propiedades fotoluminiscentes de los materiales se lleva a cabo utilizando un espectrofluorómetro. La fuente luminosa del espectrofluorómetro es una lámpara de xenón que genera un haz de luz de elevada intensidad.

El haz de luz producido por la lámpara de xenón atraviesa una serie de lentes y un monocromador, lo que permite seleccionar una longitud de onda determinada. El haz monocromático obtenido es dividido en dos, el primer haz resultante impacta en un fotodiodo de referencia y el segundo continúa su trayectoria hacia la muestra (Figura 27). Cuando el haz monocromático impacta la muestra, ésta produce emisión de luz visible en todas direcciones debido a la fluorescencia de la misma. Los fotones emitidos son captados a un ángulo recto respecto al haz de excitación y pasan por una serie de lentes y un monocromador que colecta todas las longitudes de onda. Finalmente, las longitudes de onda captadas inciden en un fotomultiplicador que analiza espectralmente la luminiscencia emitida por la muestra, digitaliza los datos y genera una gráfica de la intensidad respecto a la longitud de onda llamada espectro de emisión (Freifelder, 2003; Skoog et al., 2001).

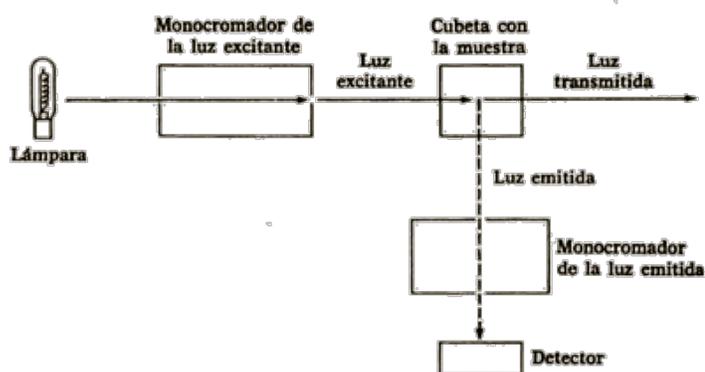


Figura 27. Esquema general de un espectrofluorómetro (Freifelder, 2003).

Una vez que se conocen las longitudes de onda en las que la muestra emite se procede a generar un espectro de excitación, esto con la finalidad de obtener la longitud de onda de excitación. El espectro de excitación se obtiene fijando la longitud de onda de emisión; generalmente, la más intensa obtenida en el espectro de emisión, y se realiza un barrido en las longitudes de onda de la región del ultravioleta del espectro electromagnético. Esto permite determinar la longitud de onda de excitación que favorecerá la emisión fluorescente del material.

III.7 Espectroscopía infrarroja

La espectroscopía infrarroja (IR) es una técnica utilizada para identificar los grupos funcionales en una muestra. Además, permite determinar los tipos de enlaces presentes en las moléculas de un material. La región infrarroja del espectro electromagnético abarca desde 7.8×10^{-7} m hasta aproximadamente 10^{-4} m, pero en espectroscopía IR suele utilizarse de 2.5×10^{-6} m hasta 2.5×10^{-5} m. Esta región suele expresarse en frecuencia (número de onda). El número de onda, representa el número de ciclos u ondas en una distancia de un centímetro, calculado como $1/\lambda$ donde las unidades utilizadas son los cm^{-1} .

Por lo tanto, la región del infrarrojo utilizado en la espectroscopía IR abarca desde 5000 cm^{-1} a 670 cm^{-1} (Bailey y Bailey, 1998; McMurry y Cervantes, 2008).

Este intervalo de frecuencias es utilizado debido a que es comparable al rango donde las moléculas vibran de manera natural. Las moléculas se mantienen unidas por enlaces que vibran de manera constante a medida que los átomos que las conforman se acercan y alejan unos de otros. Los enlaces de una molécula pueden absorber energía y aumentar la amplitud en sus vibraciones (Atkins y Jones, 2006; Bailey y Bailey, 1998; Weininger y Stermitz, 1988).

Las frecuencias a las cuales una molécula vibra depende de las masas de los átomos que la componen, del tipo de enlace y su rigidez. La rigidez de los enlaces son directamente proporcionales a la fuerza de éstos. Por ejemplo, átomos unidos por enlaces rígidos tienen una mayor frecuencia de vibración que átomos unidos por enlaces débiles (Figura 28) (Atkins y Jones, 2006; Bailey y Bailey, 1998).

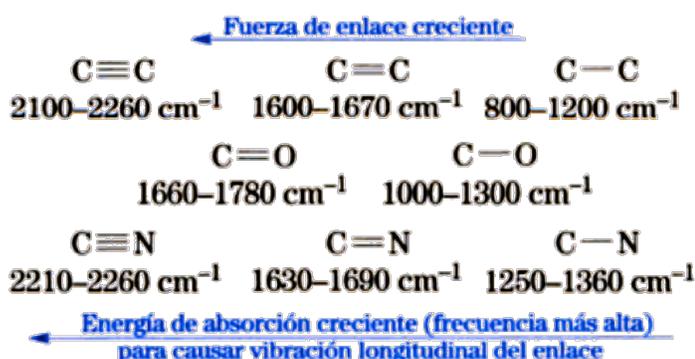


Figura 28. La frecuencia requerida para producir vibraciones en los enlaces es proporcional a la fuerza de éstos (Bailey y Bailey, 1998).

Cuando una molécula se somete a radiaciones de 5000 cm^{-1} a 670 cm^{-1} , sus enlaces pueden vibrar de manera longitudinal o plegada (flexiones) (Figura 29) si las energías coinciden con las frecuencias de vibración y ocurre un cambio de polaridad en la molécula.

Las absorciones más intensas de IR se dan entre las vibraciones de los enlaces más polares como, C=O y O-H (Atkins y Jones, 2006; Weininger y Stermitz, 1988).

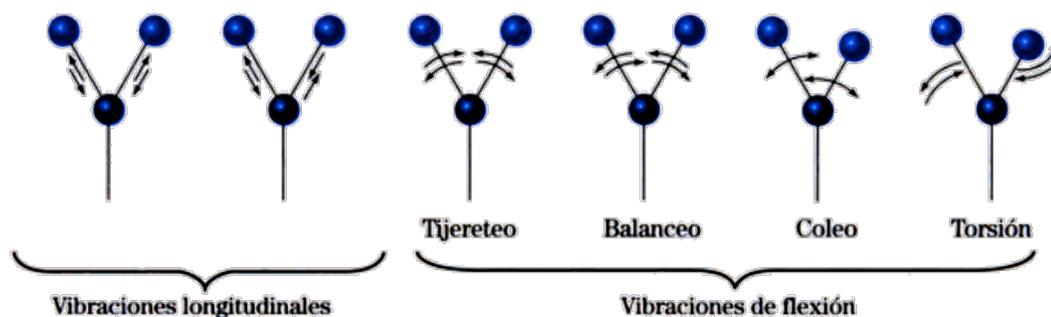


Figura 29. Diferentes vibraciones moleculares causadas al hacer incidir radiación infrarroja (Bailey y Bailey, 1998).

La espectroscopía IR se utiliza para llevar a cabo un análisis cualitativo de los diferentes enlaces y grupos funcionales característicos que contiene una molécula, ya que cada enlace en una molécula absorbe a energías específicas del infrarrojo. En el caso de moléculas simples la identificación es sencilla, pero en el caso de moléculas poliatómicas es muy difícil. La identificación de moléculas poliatómicas mediante espectroscopía IR se realiza identificando las bandas de absorción características asociadas a varios grupos específicos en el espectro (Atkins y Jones, 2006; Weininger y Stermitz, 1988).

El análisis de espectroscopía IR se realiza mediante un espectrofotómetro infrarrojo como el que se muestra en la Figura 30; éste consta de una fuente de radiación infrarroja que genera un haz de luz con todas las frecuencias del infrarrojo. El haz generado es dividido en dos, uno de los haces llamado haz de referencia pasa directamente a un monocromador, mientras que el otro incide a la muestra que se pretende analizar y después pasa al monocromador (Atkins y Jones, 2006; Weininger y Stermitz, 1988).

El monocromador selecciona las frecuencias del IR de una en una de los dos haces divididos y las hace pasar a un detector. El detector emite una señal electrónica correspondiente a la intensidad de luz que recibe de ambos haces, lo que permite medir directamente la luz absorbida o transmitida por la muestra a cualquier longitud de onda. Finalmente, se genera un registro que grafica los datos de manera continua de la luz transmitida o absorbida por la muestra para cada frecuencia utilizada (Weininger y Stermitz, 1988).

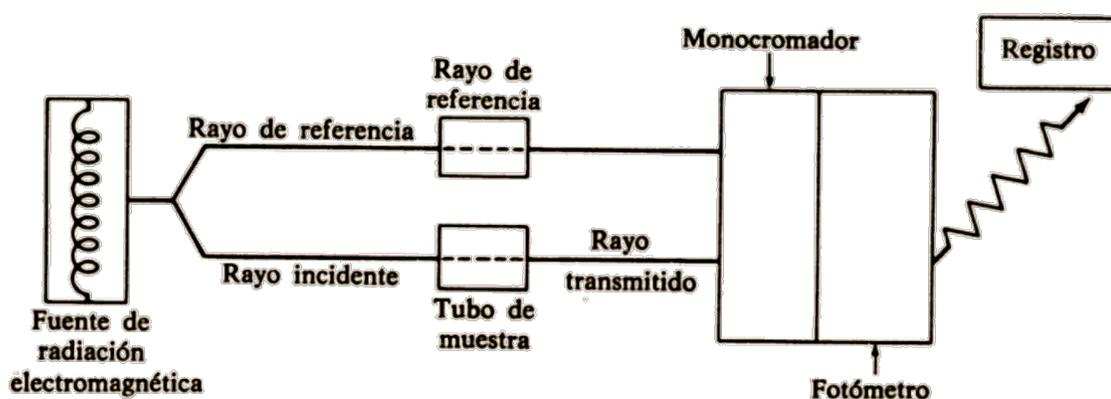


Figura 30. Espectrofotómetro de infrarrojo (Allinger et al., 1984).

III.8 Funcionalización de nanopartículas con proteínas

Las nanopartículas (NPs) ofrecen ventajas como herramientas terapéuticas y de diagnóstico debido a su diseño flexible, a su tamaño y gran área superficial (Huang et al., 2011; A. Zhang et al., 2012). Además, dependiendo del tipo de NPs inorgánicas sintetizadas (nanopartículas semiconductoras, metálicas, óxidos de metales o con impurificaciones con iones lantánidos) se pueden obtener propiedades magnéticas, plasmónicas, radioluminiscentes, fosforescentes, fluorescentes o combinaciones de estas propiedades (Janib et al., 2010; Janowski et al., 2012; Rai et al., 2010). Sin embargo, las NPs resultantes requieren modificaciones superficiales para obtener estabilidad coloidal en

el medio biológico o para funcionalizar su superficie con proteínas, fármacos, péptidos, cadenas de ADN o ligandos de interés (Nam et al., 2012). Con la finalidad de que sean capaces de diagnosticar, aplicar una terapia dirigida y monitorizar la respuesta al tratamiento (Janib et al., 2010; Rai et al., 2010).

La funcionalización de nanopartículas con proteínas puede definirse como la unión de dos moléculas que se mantienen estables con la finalidad de obtener nuevas propiedades o cumplir funciones específicas como liberar medicamento, detectar moléculas o células de interés. Para llevar a cabo la funcionalización, el primer paso es realizar una conjugación de las NPs mediante modificaciones de su superficie. Muchas estrategias se han desarrollado para llevar a cabo las modificaciones superficiales, y se pueden categorizar por el tipo de moléculas que se utilizan; pequeños ligandos de superficie, polímeros y lípidos (Nam et al., 2012).

El método y tipo de ligando a utilizar dependen de la conformación molecular de la nanopartícula y de la proteína, péptido o fármaco a funcionalizar. El proceso de conjugación se puede clasificar dependiendo del tipo de enlace que mantiene unidas las nanopartículas con el ligando. La reacción y la representación de este proceso se puede observar en la Tabla X.

En esta investigación se utilizó una conjugación covalente y el ligando de superficie seleccionado fue la carbodiimida. La razón de utilizar esta pequeña molécula como ligando de superficie es que mantiene al mínimo el tamaño hidrodinámico (Nam et al., 2012). La carbodiimida tiene dos grupos funcionales, uno es utilizado para interactuar con la nanopartícula y el otro para interactuar con la proteína, en este caso, con las cadenas laterales de los aminoácidos que estructuran a la albúmina sérica bovina (BSA).

Tabla X. Representación del proceso de conjugación de las nanopartículas inorgánicas. El círculo rojo representa a las NPs y el óvalo azul representa el enlace destinado para la funcionalización (Nam et al., 2012).

Reacción		Dibujo esquemático
Conjugación covalente	Química de carbodimida	
	Adición de Michael	
	Química click (azida-alquino cicloadición)	
	Cicloadición Diels-Alder (cicloalcanos-tetrazina cicloadición)	
	Ligación hidrazona	
Conjugación no covalente	Conjugación electrostática	
	Afinidad de metal de coordinación	
	Interacción biotina-avidina	

La reacción de funcionalización de las nanopartículas de HAp:Dy³⁺ con la albúmina sérica bovina utilizando el clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) para la conjugación entre ambas moléculas se observa en la Figura 31. Donde las condiciones del medio son un pH de 4.5 y una temperatura de 37 °C para que se lleve a cabo la reacción. La carbodiimida reacciona con los grupos OH⁻ de las nanopartículas de HAp:Dy³⁺ para formar O-acilisoureas como intermediarios activos, debido a que son inestables en medios acuosos y fácilmente desplazados por los ataques nucleofílicos de los grupos amino protonados (-NH₃⁺) de las cadenas laterales de la albúmina. Los grupos amino de la proteína forman un enlace con los carbonos activos de la carbodiimida, dejando como producto la funcionalización de las nanopartículas y las proteínas y como subproductos derivados de la urea (Isoureas) (Hermanson, 2010).

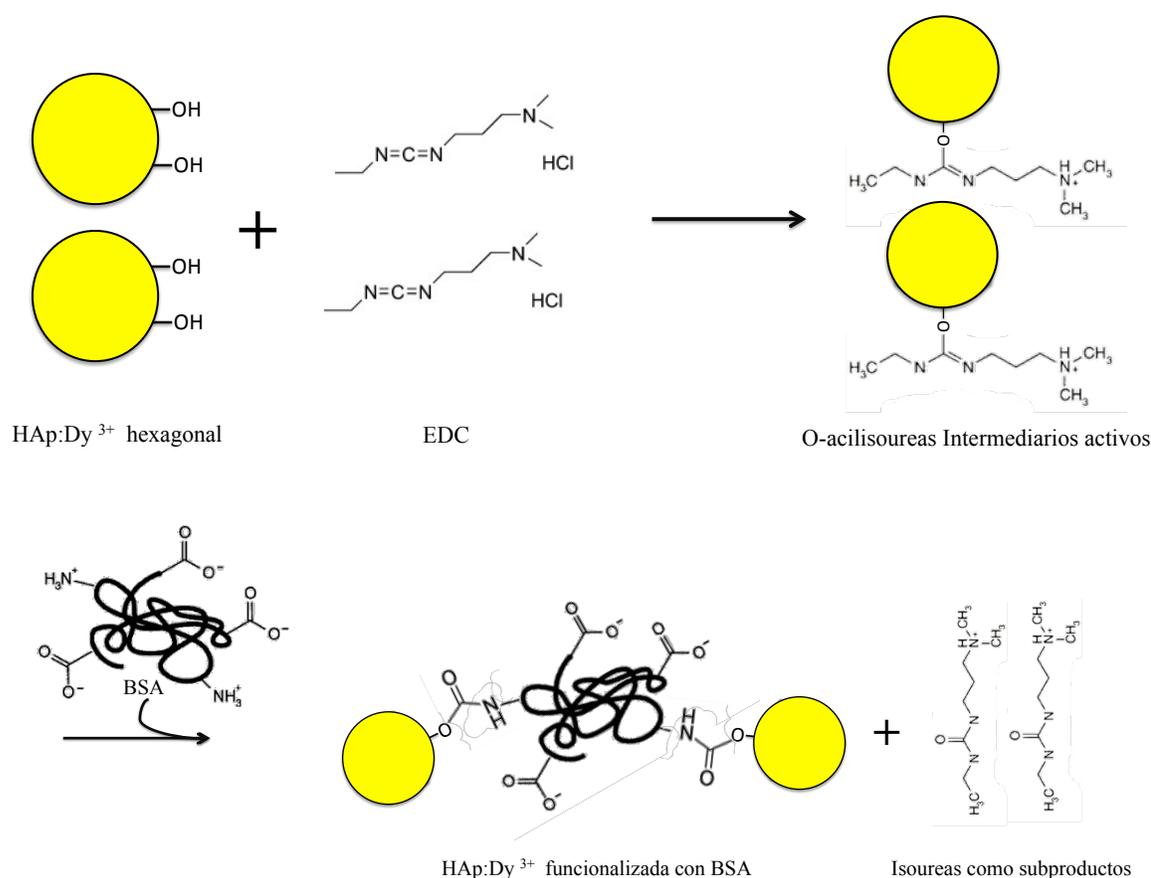


Figura 31. Esquema de la reacción de funcionalización de las nanopartículas de hidroxiapatita impurificada con disprosio (HAp:Dy³⁺) con la proteína albúmina sérica bovina (BSA).

Los compuestos de carbodiimida proporcionan un método popular y versátil para realizar la conjugación y modificación de aminoácidos, péptidos, proteínas y diferentes grupos funcionales. Dentro de los compuestos de carbodiimida solubles en agua, el 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) clorhidrato de carbodiimida (EDC) es el compuesto más común y fácilmente disponible para realizar la conjugación en medios acuosos (Hermanson, 2010).

IV. Materiales y método

En este capítulo se detallan los elementos necesarios y los métodos utilizados para la realización de los experimentos. En primer lugar se describen los reactivos y materiales necesarios, en segundo lugar la síntesis de la HAp:Dy³⁺ por el método sol-gel asistido con ácido tartárico, en tercer lugar se detallan los pasos realizados para el estudio del comportamiento de fluorescencia de la HAp:Dy³⁺ en diferentes fluidos, en cuarto lugar se describen las pruebas de estabilidad del material en agua bajo diferentes valores de pH, en quinto se describe el proceso de funcionalización con albúmina sérica bovina, y finalmente se describen los equipos utilizados para realizar la caracterización del material.

IV.1 Reactivos y materiales

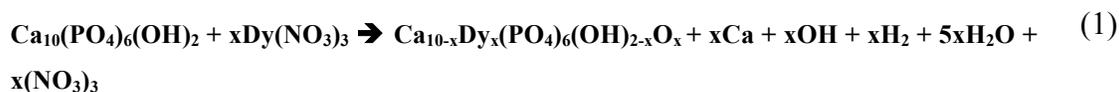
Para la síntesis: Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ (99%, Sigma Aldrich), ácido L-Tartárico (C₄H₆O₆, 99%, Acros Organics), Dy(NO₃)₃•5H₂O (99.9%, REacton), y HNO₃ (70%, Fisher Scientific).

Para la funcionalización: albúmina sérica bovina (BSA) (≥99%, Sigma Aldrich), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (≥98.5%, Sigma Aldrich), Trizma base (≥99.9%, Sigma Aldrich) (estos reactivos fueron usados sin algún otro proceso de purificación), y HCl (36.6%, Faga Lab).

IV.2 Síntesis de HAp:Dy³⁺

La síntesis de HAp:Dy³⁺ se realizó por el método sol-gel asistido con ácido tartárico, utilizando una versión modificada descrita por Taxax y colaboradores, donde sintetizaron nanopartículas de Y₂O₃:Eu³⁺ (Taxak et al., 2009).

La estequiometría de la reacción fue la siguiente:



Donde x representa la variación de fracción molar.

$$\text{Variación de fracción molar} = \frac{(\text{Cantidad de elementos sustituibles})(\text{Impurificación molar})}{\text{Molécula (1)} + \text{Impurificación molar}} \quad (2)$$

En este trabajo se llevaron a cabo varias secuencias de síntesis, donde se utilizaron impurificaciones de Dy^{3+} del 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 %. El procedimiento utilizado se muestra a continuación (Figura 32):

- I. $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y $\text{Dy}(\text{NO}_3)_3$ fueron pesados estequiométricamente en base a la ecuación 1, y disueltos en 35 ml de agua destilada. Después un mínimo de HNO_3 (35% molar) fue agregado con lo cual se obtuvo una solución transparente.
- II. Ácido L-Tartárico fue disuelto en 10 ml de agua destilada en una solución individual. La concentración molar de ácido L-Tartárico fue de una proporción 1:2 respecto los iones metálicos presentes en la HAp.
- III. La solución de L-Tartárico fue agregada a la solución principal y dejada en agitación constante en la plancha de calentamiento por 24 horas a temperatura ambiente. Una vez concluidas las 24 horas se verificó que el pH de la reacción se encontrara en ~ 0.5 .
- IV. La mezcla fue calentada a 80°C , en agitación constante utilizando una plancha de calentamiento por un período de 2 h con la finalidad de reducir el volumen de la solución para formar la fase “sol”.

- V. Después, la solución en fase sol fue calentada a 120 °C en una plancha de calentamiento y agitación constante hasta la formación de la fase gel, subsecuentemente, éste fue secado para obtener el precursor (xerogel).
- VI. El xerogel fue colectado y dividido en 2 porciones de igual peso. Cada porción fue sometida a un tratamiento térmico de 800 °C y 1000 °C por 3 h, respetivamente.



Figura 32. Síntesis de HAp:Dy³⁺ por el método sol-gel.

IV.3 Estudio del comportamiento de la fluorescencia de la HAp:Dy³⁺ en fluidos

Los análisis de fotoluminiscencia de HAp:Dy³⁺ se realizaron en tres diferentes fluidos: agua destilada (pH de 7.5), suero sanguíneo y orina humana.

El suero sanguíneo fue obtenido de la centrifugación de muestras de sangre a 11 000 rpm por 3 min en una centrífuga para hematocrito (LW Scientific) y conservado en hielo. La orina humana fue obtenida fresca y conservada en un recipiente oscuro para evitar su descomposición. Ambos fluidos corporales fueron donados. El procedimiento que se realizó para cada fluido se describe a continuación:

- I. Se analizó 1 ml de cada fluido por PL a una $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ (referencia).
- II. 1 mg de HAp:Dy³⁺ fue mezclado en 1 ml del fluido (suero sanguíneo, orina o agua destilada) y fue dispersado en baño de ultrasonido en frío por 30 segundos.

- III. La mezcla de HAp:Dy³⁺ y el fluido correspondiente se colocó en una celda de cuarzo (evitando que el material precipitara), y fue analizada por PL a una $\lambda_{\text{ex}}= 350$ nm.

IV.4 Pruebas de estabilidad de fluorescencia de la HAp:Dy³⁺ en agua bajo diferentes valores de pH

Las pruebas de estabilidad en agua destilada se realizaron en dos etapas.

La primera etapa consistió en:

- I. Introducir 1 mg de HAp:Dy³⁺ en tubos Eppendorf y agregarles 1 ml de agua destilada (pH 7.2).
- II. La mezcla de HAp:Dy³⁺ y agua, se colocó en una celda de cuarzo y fue analizada por PL a una $\lambda_{\text{ex}}= 350$ nm.
- III. Una vez finalizada las mediciones de la mezcla, ésta se devolvió a su tubo Eppendorf correspondiente. Se esperó un período de 20 minutos y se volvió a realizar la medición de fotoluminiscencia.
- IV. El proceso de medición de PL cada 20 minutos se repitió por un lapso de una hora. Finalmente, el material en agua se regresó a los tubos Eppendorf.

En la segunda etapa:

- I. Se analizó 1 ml de agua destilada a un pH de 5.6 por PL a una $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm (referencia).
- II. Se colocaron una serie de 12 tubos Eppendorf a los cuales se les agregó 1 mg de muestra a cada uno y se procedió a adicionarles 1 ml de agua destilada a un pH de 5.6.
- III. Después se llevó a cabo la modificación del pH de las muestras. Cuatro tubos a un pH de 3.5 agregándoles ácido nítrico, 4 tubos a un pH de 10.5 agregándoles hidróxido de amonio y los tubos restantes se conservaron a un pH de 5.6. Los 12 tubos se mantuvieron en constante movimiento para evitar que la HAp:Dy^{3+} precipitara.
- IV. La mezcla de cada tubo fue analizada por PL a una $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm. Evitando que el material precipitara en la celda de cuarzo.

IV.5 Funcionalización de HAp:Dy^{3+} con BSA

Antes de llevar a cabo el proceso de funcionalización se prepararon tres soluciones: una solución de BSA con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, una de EDC al 0.1 M, y una de Tris-HCl a 10 mM (pH 5.5).

El procedimiento de funcionalización de HAp:Dy^{3+} con albúmina sérica bovina ($\text{HAp:Dy}^{3+}@BSA$) se describe a continuación:

- I. Las muestras se prepararon en tubos Eppendorf en base a la Tabla XI.

- II. Una vez realizada la preparación de las muestras, éstas se sometieron a baño maría por 2 horas a 37 °C con agitación cada 30 min.
- III. Después, las muestras fueron centrifugadas a 6 000 rpm por 2 min a 4 °C en una centrífuga con refrigeración (Allegra, Beckman Coulter).

Tabla XI. Preparación de las muestras para funcionalización.

Orden	Reactivo	Tubo 1	Tubo 2
1	HAp:Dy ³⁺	0.05 g	0.05 g
2	Tris-HCl 10 mM	940 µl	950 µl
3	BSA	50 µl	50 µl
4	EDC	10 µl	-
Volumen total		1 ml	1 ml

- IV. El sobrenadante fue decantado y los polvos de HAp:Dy³⁺ fueron resuspendidos en agua destilada, y se volvió a centrifugar a 6 000 rpm por 2 min a 4 °C. Este paso fue repetido 9 veces con la finalidad de eliminar el excedente de proteína, es decir, la proteína que no se unió a las nanopartículas.
- V. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 6 000 rpm por 2 min a 4 °C, el sobrenadante fue decantado y los polvos fueron analizados mediante espectroscopía IR.

IV.6 Caracterización

Los patrones de difracción de rayos X se obtuvieron con un difractómetro Philips X'pert con radiación CuK_α ($\lambda = 0.15406 \text{ nm}$), utilizando un intervalo de $2\theta = 10\text{--}80^\circ$ con pasos de medición de 0.1° y 1 segundo por punto. Las imágenes de TEM fueron obtenidas con un microscopio JEOL-2010 utilizando un voltaje de aceleración de 200 kV. Las imágenes de SEM y los espectros EDS fueron obtenidos con un microscopio JEOL JSM-5300 equipado con un espectroscopio de dispersión de rayos X modelo Thermo Noran Superdry II. Los espectros de fotoluminiscencia fueron analizados con un espectrofluorómetro Hitachi FL-7000. Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos utilizando un espectrómetro Nicolet 6700 con dispositivo de reflectancia total atenuada con una resolución de 2 cm^{-1} y la acumulación de 32 exploraciones.

V. Resultados y discusión

En este capítulo se presentan y discuten los resultados de los análisis realizados a la hidroxiapatita impurificada con disprosio (HAp:Dy³⁺) sintetizada por el método sol-gel asistido con ácido tartárico. Los análisis realizados fueron el comportamiento de la fluorescencia de la HAp:Dy³⁺ inmersa en agua con diferentes valores de pH, en orina y en suero humano, y finalmente, los análisis de la funcionalización de la HAp:Dy³⁺ con albúmina sérica bovina (HAp:Dy³⁺@BSA). Las propiedades fotoluminiscentes (espectros de emisión y excitación) de las nanopartículas de HAp:Dy³⁺, antes y después de sumergirlas en los diferentes fluidos, se analizaron por fotoluminiscencia (PL). La estructura cristalina y la composición del material se determinó por difracción de rayos X (XRD) y espectroscopía de dispersión de energía (EDS). La morfología y el tamaño de las nanopartículas se analizó por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Finalmente, los análisis de la funcionalización de la HAp:Dy³⁺@BSA se realizaron por espectroscopía infrarroja (IR) y PL.

V.1 Difracción de rayos X

La Figura 33 muestra los patrones de difracción de la hidroxiapatita pura y la hidroxiapatita impurificada con 0.5% de disprosio (HAp:0.5 Dy³⁺) a dos diferentes tratamientos térmicos, 800 °C y 1000 °C por 3 h.

Los patrones de difracción para la HAp:0.5 Dy³⁺ horneada a 800 °C (Figura 33b) presentan picos de difracción bien definidos, los cuales pueden ser indexados a la fase hexagonal de la hidroxiapatita de acuerdo con la tarjeta de cristalografía JCPDS No. 09-0432. No se detectó la formación de otras fases cristalinas secundarias. Los patrones de difracción de la HAp:0.5 Dy³⁺ con un tratamiento térmico de 1000 °C (Figura 33c), de

igual manera, presentan picos de difracción bien definidos correspondientes a la fase hexagonal de la hidroxiapatita que son más intensos en comparación con los resultados obtenidos a 800 °C, lo que indica una mayor cristalinidad. Ambos resultados tienen similitud con los patrones de difracción de la hidroxiapatita pura, pero la muestra con un tratamiento térmico de 1000 °C presenta trazas de la fase β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. La formación de β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ es común cuando la hidroxiapatita es sometida a tratamientos térmicos mayores a 1000 °C (Demirkiran et al., 2010; Graeve et al., 2010). No se logró detectar ninguna fase relacionada con el Dy^{3+} ya que la impurificación 0.5% es una concentración muy baja.

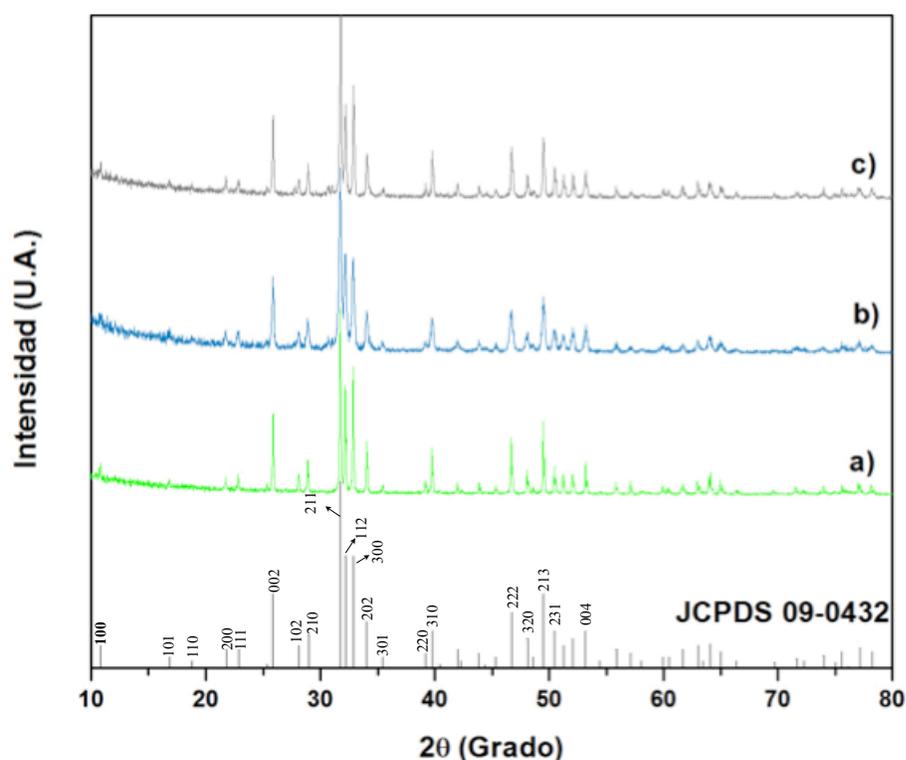


Figura 33. Patrones de XRD. a) Hidroxiapatita pura (Aldrich, 99 %, USA), b) HAp:0.5 Dy^{3+} a 800 °C por 3 h y c) HAp:0.5 Dy^{3+} a 1000 °C por 3 h.

La Figura 34 muestra los patrones de difracción de la hidroxiapatita pura y de la hidroxiapatita impurificada con 5% de disprosio (HAp:5 Dy^{3+}) con dos tratamientos térmicos, 800 °C y 1000 °C. Los picos de difracción corresponden a la fase hexagonal de la

hidroxiapatita, de la misma manera, que para los patrones de difracción de la HAp:0.5 Dy³⁺. Con el tratamiento térmico de 1000 °C, también aparecen las trazas de β-Ca₃(PO₄)₂. No se detectaron otras fases relacionadas con la impurificación del 5% de Dy³⁺. Estos resultados indican que los iones de Dy³⁺ han sido incorporados exitosamente en la estructura cristalina de la Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂. Yang y colaboradores reportaron resultados similares para la impurificación de hidroxiapatita con 5% de Eu³⁺ (P. Yang et al., 2008).

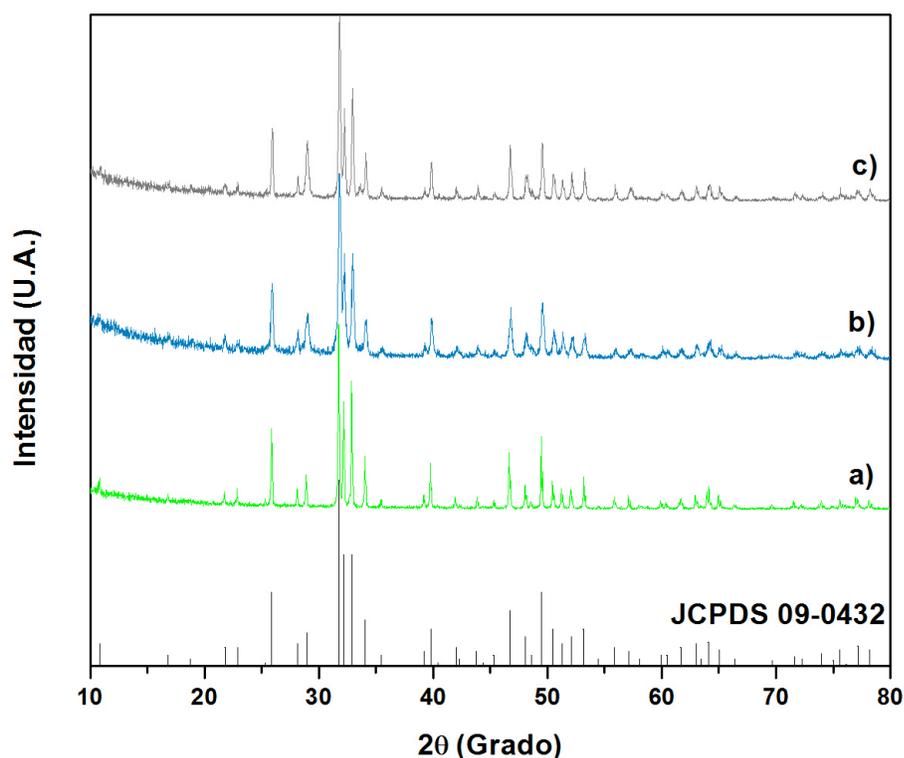


Figura 34. Patrones de XRD. a) Hidroxiapatita pura (Aldrich, 99 %, USA), b) HAp:5 Dy³⁺ a 800 °C por 3 h y c) HAp:5 Dy³⁺ a 1000 °C por 3 h.

Los resultados de DRX mostrados en las figuras 33 y 34, indican que los productos finales fueron la formación de la fase hexagonal de la hidroxiapatita con una correcta incorporación de los iones de Dy³⁺ a la red, y un aumento de la cristalinidad conforme aumenta la temperatura (D. M. Liu et al., 2001). La HAp:Dy³⁺ sintetizada por el método sol-gel asistido con ácido tartárico con un tratamiento térmico de 800 °C presenta la

formación de la fase hexagonal de la apatita de manera homogénea. Las características cristalinas obtenidas (una fase homogénea y alta cristalinidad) en la hidroxiapatita van encaminadas a la aplicación de la misma como plataforma ideal para el desarrollo de teranósticos.

V.2 Microscopía electrónica de barrido

La Figura 35 muestra las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de los polvos de la HAp:0.5 Dy³⁺ con un tratamiento térmico de 800 °C y 1000 °C. Las imágenes muestran polvos amorfos y agregados. La HAp:0.5 Dy³⁺ horneada 800 °C (Figura 35a) muestra la formación de láminas agregadas con poros en su superficie. A 1000 °C (Figura 35b) los polvos parecen aglomerarse y presentan láminas más separadas y con una mayor porosidad en comparación con el tratamiento térmico de 800 °C. La morfología en ambas imágenes no parece seguir algún patrón en particular.

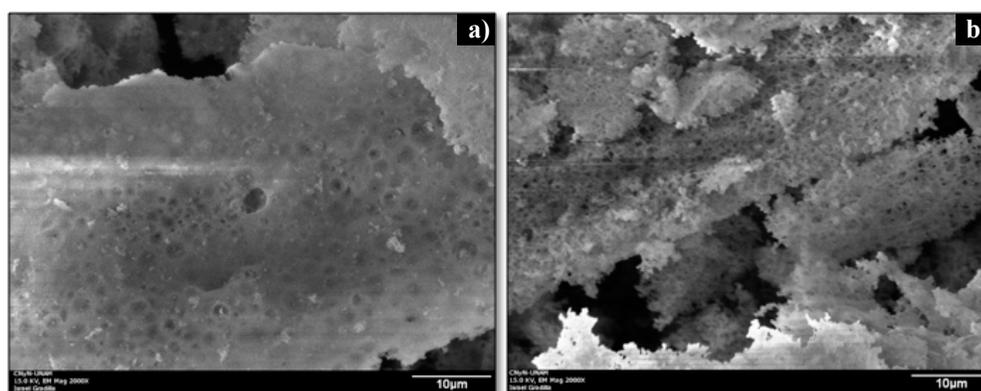


Figura 35. Imágenes de SEM de HAp:0.5 Dy³⁺. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h.

La Figura 36 muestra la morfología de los polvos de la HAp:5 Dy³⁺ con un tratamiento térmico de 800 °C y 1000 °C. Las muestras de la HAp:Dy³⁺ al 0.5 y 5% de Dy³⁺, con un tratamiento térmico de 800 °C, mantienen una similitud en morfología. Sin embargo, a

1000 °C los polvos de HAp:5 Dy³⁺ presentan aglomeración y poros semicirculares de diversos tamaños que predominan en la estructura, estos resultados difieren mucho de la muestra con 0.5% de Dy³⁺ con el mismo tratamiento térmico. Mientras que en la Figura 35b los resultados de la impurificación de la hidroxiapatita con 0.5% de disprosio se observan láminas porosas y separadas. En la Figura 36b con una impurificación de disprosio del 5% se observan estructuras aglomeradas y sobre puestas donde predominan poros semicirculares.

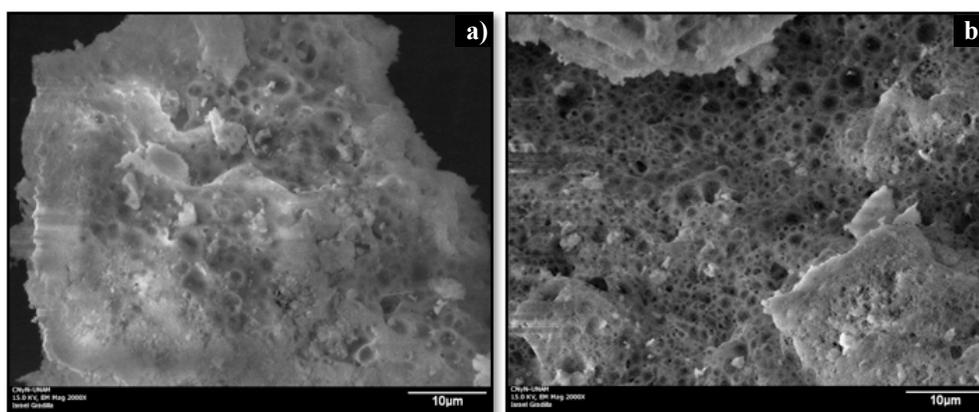


Figura 36. Imágenes de SEM de HAp:5 Dy³⁺. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h.

V.3 Espectroscopía de dispersión de energía

Los análisis de espectroscopía de dispersión de energía (EDS) de la hidroxiapatita impurificada con 0.5% de disprosio con un tratamiento térmico de 800 °C y de 1000 °C, confirman la presencia de calcio, fósforo y oxígeno. El disprosio no se observa debido a que la concentración de 0.5% de disprosio es muy baja (Figura 37).

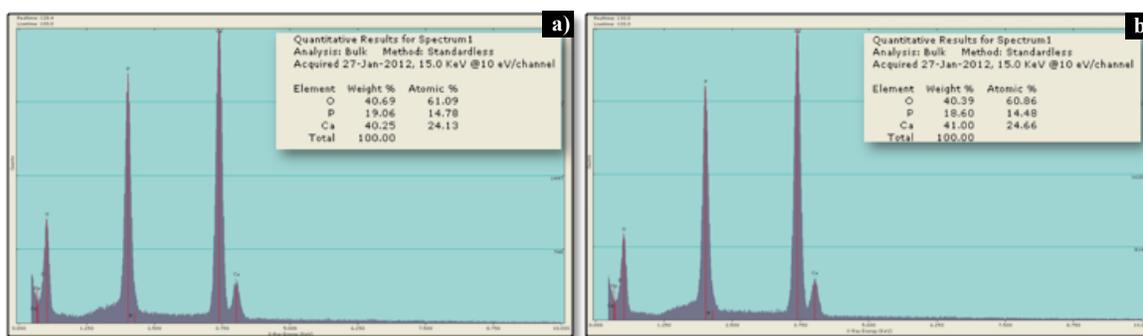


Figura 37. Espectro EDS de HAp:0.5 Dy³⁺. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h.

La Figura 38 muestra los resultados de EDS de la hidroxiapatita impurificada con 5% de disprosio (HAp:5 Dy³⁺) con un tratamiento térmico de 800 °C y 1000 °C. Los espectros confirman la presencia de calcio, oxígeno, fósforo y disprosio. Considerando que EDS es un método semi-cuantitativo los porcentajes en peso de disprosio de 4.17% y 3.96% de ambos espectros, corresponden a la composición de 5% de disprosio del material.

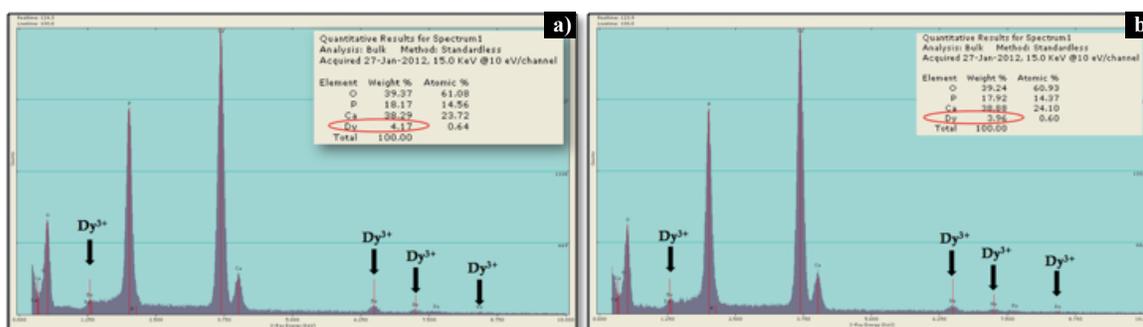


Figura 38. Espectro EDS de HAp:5 Dy³⁺. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h.

V.4 Microscopía electrónica de transmisión

La Figura 39 muestra las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la HAp:5 Dy³⁺ con un tratamiento térmico de 800 °C y 1000 °C. En la muestra horneada a

800 °C se observan nanopartículas uniformes y porosas con diámetros desde los 50 nm a los 200 nm (Figura 39a). Con el aumento de tratamiento térmico a 1000 °C se produce un crecimiento de las nanopartículas con un intervalo diámetro de entre 200 nm y 1000 nm (Figura 39b) que presentan una mayor aglomeración en comparación con los resultados obtenidos a 800 °C. Con el tratamiento térmico de 1000 °C las estructuras son menos porosas y más gruesas, lo que impide distinguir los planos cristalinos presentes. El aumento en la aglomeración de las partículas de hidroxiapatita conforme aumenta la temperatura del tratamiento térmico es un efecto común (Graeve et al., 2010).

La porosidad de las nanopartículas de HAp:Dy³⁺ podría ser utilizada para introducir una amplia diversidad de moléculas y transportarlas intactas hasta sus blancos (Hou et al., 2009). Yang y colaboradores reportaron el uso de la superficie porosa de la hidroxiapatita para la carga y liberación de moléculas de ibuprofeno *in vitro* (P. Yang et al., 2008), mientras que Hou y colaboradores realizaron pruebas *in vitro* de carga y liberación de moléculas de captopril, utilizando la hidroxiapatita como sistema de transporte (Hou et al., 2009).

La HAp:Dy³⁺ como una plataforma ideal para el desarrollo de teranósticos, requiere partículas con tamaños menores a 100 nm y que no presenten aglomeración.

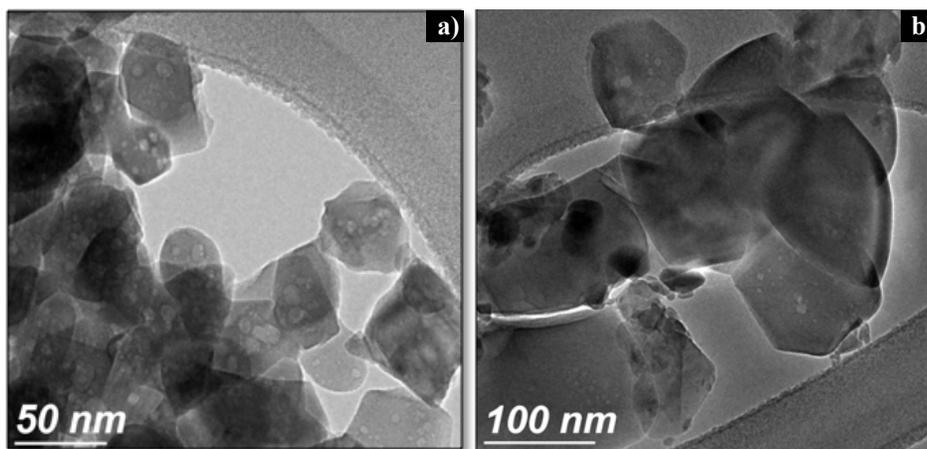


Figura 39. Imágenes de TEM de HAp:5 Dy³⁺. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h.

Para intentar resolver el problema de la aglomeración de las nanopartículas con un tratamiento térmico de 800 °C, las muestras fueron sumergidas en etanol absoluto y se sometieron a ultrasonido en frío durante 3 h, después fueron filtradas al vacío, y finalmente analizadas por TEM.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 40. Las nanopartículas se lograron separar un poco pero se siguió presentando la aglomeración. En la imagen de baja resolución se observa la separación de partículas en la muestra (Figura 40a), la nanopartícula semicircular presenta un tamaño de alrededor de 50 nm y poros en su superficie.

En la imagen de alta resolución de la nanopartícula de la HAp:5 Dy³⁺ (Figura 40b) se observan los planos [100] característicos de la estructura hexagonal de hidroxiapatita (el pico de difracción correspondiente se puede ver en los patrones de difracción de la Figura 33). La distancia de 0.82 nm entre las franjas adyacentes concuerdan bien con los datos calculados a partir de los patrones de difracción de rayos X encontrados en la literatura (JCPDS No. 09-0432) (C. Zhang et al., 2009).

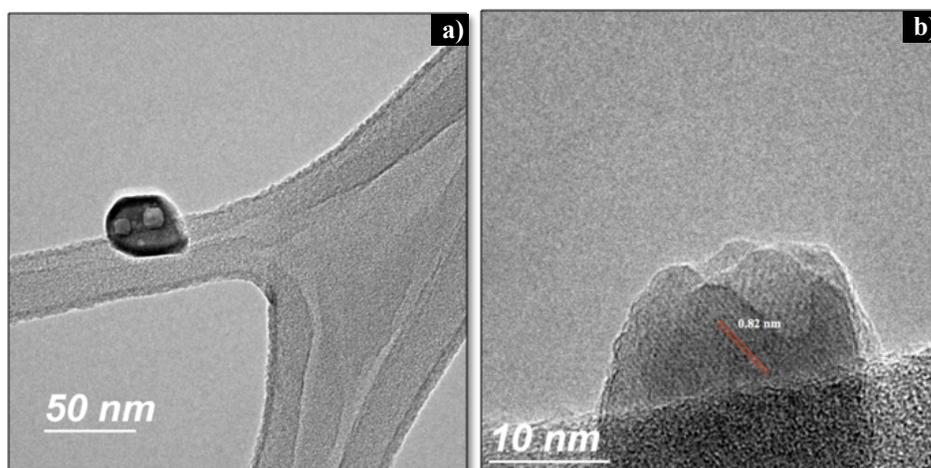


Figura 40. Imágenes de TEM de HAp:5 Dy³⁺ con un tratamiento térmico de 800 °C por 3 h. a) Imagen de baja resolución y b) Imagen de alta resolución de mostrando los planos [100] separados por 0.82 nm.

Una solución a los problemas de aglomeración que presentan las nanopartículas podría ser realizar modificaciones al método de síntesis.

V.5 Fotoluminiscencia

La Figura 41 muestra los espectros de excitación de la hidroxiapatita impurificada con 0.5% de disprosio (HAp:0.5 Dy³⁺) con un tratamiento térmico de 800 °C y 1000 °C, utilizando una longitud de onda de emisión en 574 nm. El espectro muestra cinco picos de absorción bien definidos centrados en 295 nm, 324 nm, 350 nm, 364 nm y 389 nm respectivamente. La longitud de onda mayor de absorción se centra en los 350 nm. El incremento en la temperatura de tratamiento térmico no parece influir en las posiciones de las longitudes de onda a las cuales absorbe el material.

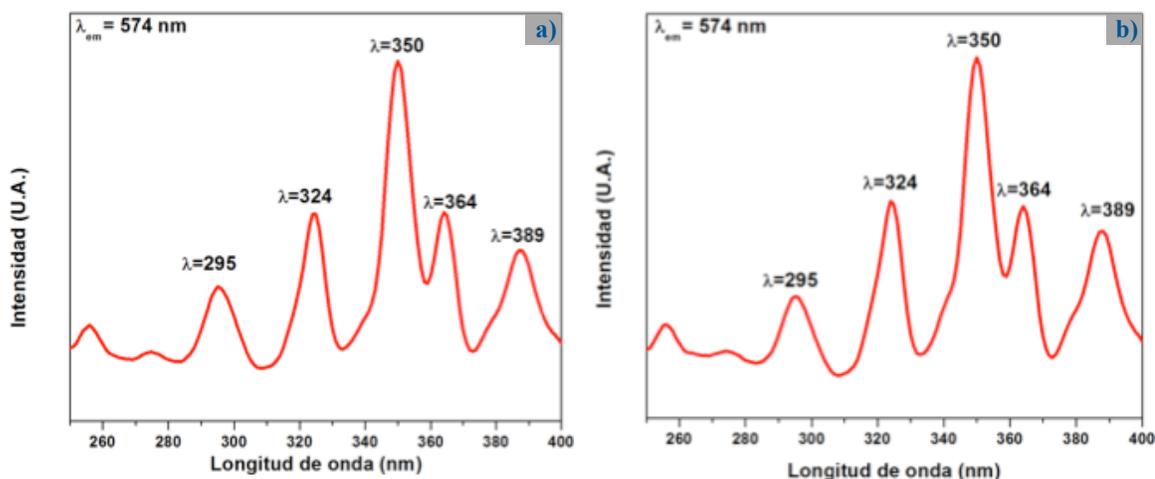


Figura 41. Espectros de excitación de HAp:0.5 Dy³⁺. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h.

La Figura 42 muestra los espectros de excitación de la hidroxiapatita impurificada con 5% de disprosio (HAp:5 Dy³⁺) con un tratamiento térmico de 800 °C y 1000 °C, utilizando una longitud de onda de emisión en 592 nm. El espectro presenta seis picos de absorción

bien definidos que no varían de posición respecto a la diferencia de temperatura del tratamiento térmico, pero presenta distintas longitudes de onda de absorción en comparación con las longitudes de absorción de la impurificación del 0.5% de Dy^{3+} (Figura 41). Los espectros de la impurificación de 5% de disprosio (Figura 42), presentan los picos de absorción centrados en 295 nm, 319 nm, 341 nm, 356 nm, 380 nm y 389 nm respectivamente. En estos espectros el pico de mayor absorción se centra en los 341 nm. Los espectros de excitación presentan un corrimiento en las longitudes de onda en comparación con la impurificación de 0.5% de disprosio, los únicos picos de absorción que se presentan en ambas figuras a las mismas longitudes de onda son los picos centrados en 295 nm y 389 nm. Las transiciones de absorción óptica correspondientes a las longitudes de onda de la Figura 41 y de la Figura 42 se encuentran dentro de las transiciones electrónicas de absorción de la configuración $4f^9$ del Dy^{3+} (Madhukumar et al., 2007; Song et al., 2011).

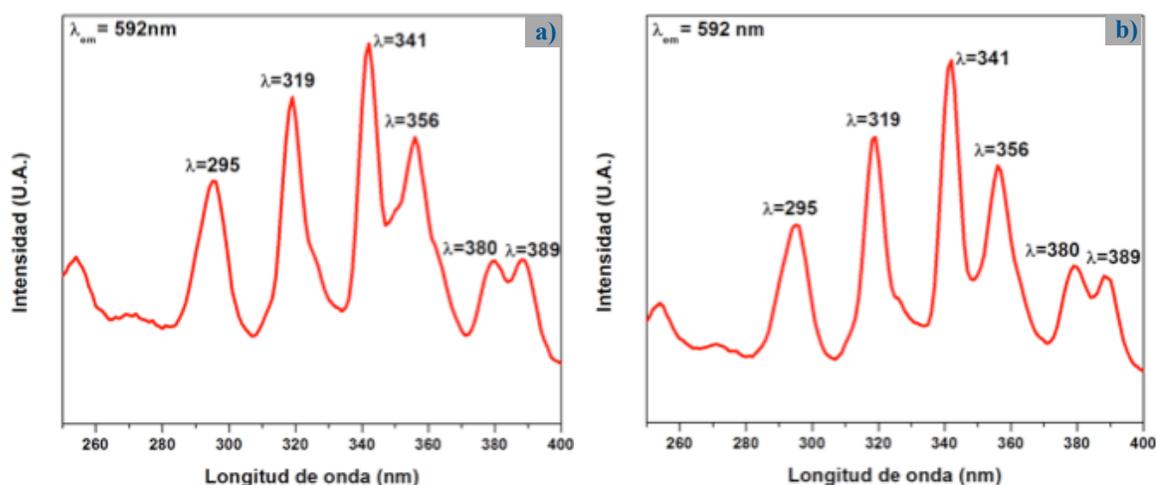


Figura 42. Espectros de excitación de HAp:5 Dy^{3+} . a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h.

La Figura 43 muestra los espectros de emisión de la HAp:0.5 Dy^{3+} a diferentes longitudes de onda de excitación (Figura 41). La HAp:0.5 Dy^{3+} presenta los espectros de emisión, los cuales son muy similares independientemente de la temperatura del tratamiento térmico. Los picos de emisión corresponden a tres de las cuatro transiciones

típicas del Dy^{3+} . Las emisiones provienen del nivel más bajo de energía del estado excitado $^4F_{9/2}$ hacia los niveles $^6H_{15/2}$, $^6H_{13/2}$ y $^7H_{9/2}$ del estado fundamental. La primera transición $^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{15/2}$ centrada en los 485 nm, la segunda transición $^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{13/2}$ centrada en los 575 nm, y la tercera transición $^4F_{9/2} \rightarrow ^7H_{9/2}$ centrada en los 755 nm, Las tres transiciones corresponden a las regiones del azul, del amarillo y del infrarrojo del espectro electromagnético, respectivamente. La transición $^4F_{9/2} \rightarrow ^7H_{11/2}$ correspondiente a la región del rojo del espectro electromagnético no se observa en los espectros de emisión (Blasse y Grabmaier, 1994; Lemanski y Deren, 2011; Madhukumar et al., 2007; Nagpure et al., 2009; Nakashima et al., 2005; Song et al., 2011).

Los dos distintos tratamientos térmicos de 800 °C y 1000 °C parecen no afectar las posiciones en longitud de onda de las transiciones de emisión de la HAp:0.5 Dy^{3+} . La temperatura del tratamiento térmico influye en la intensidad relativa de emisión debido al incremento en la cristalinidad del material. Este incremento en la intensidad relativa no se observa debido a que los espectros reportados se encuentran normalizados.

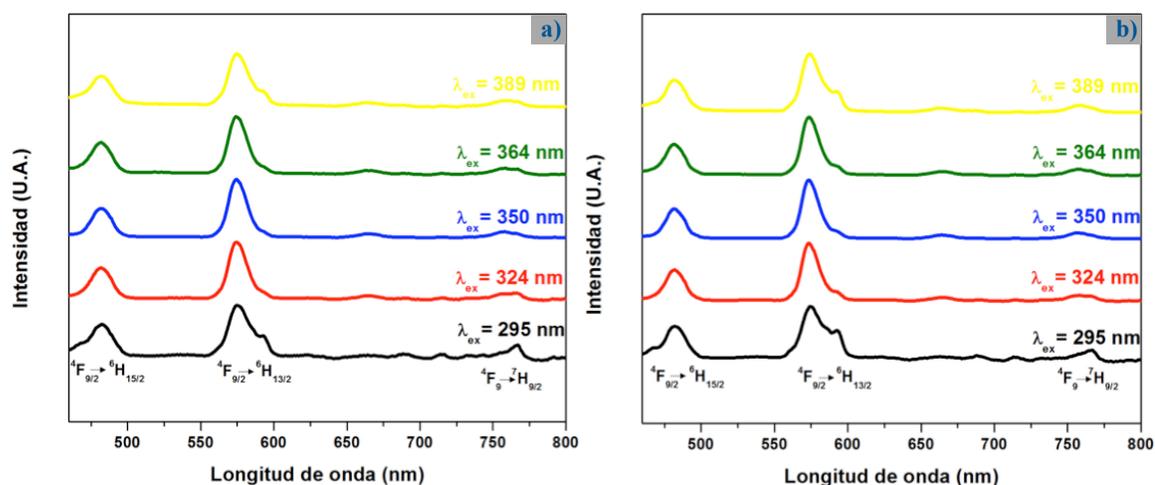


Figura 43. Espectros de emisión HAp:0.5 Dy^{3+} . a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h.

La Figura 44 muestra los espectros de emisión de la HAp:5 Dy³⁺ a diferentes longitudes de onda de excitación (Figura 42). Los picos de emisión corresponden a las transiciones típicas del Dy³⁺. La primera transición $^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{15/2}$ centrada en los 485 nm, la segunda transición $^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{13/2}$ centrada en los 575 nm, y la tercera transición $^4F_{9/2} \rightarrow ^7H_{9/2}$ centrada en los 755 nm. Las transiciones del Dy³⁺ no parecen verse afectadas por la diferencia en la temperatura del tratamientos térmico ni por el cambio en la concentración de iones de Dy³⁺ en las diferentes muestras.

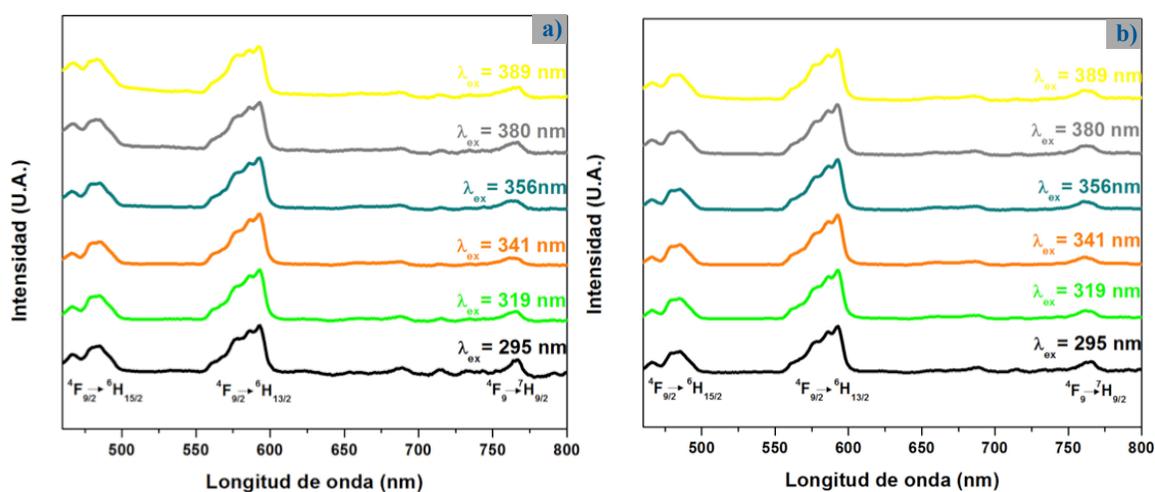


Figura 44. Espectros de emisión HAp:5 Dy³⁺. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h.

Los espectros de emisión de la HAp:0.5 Dy³⁺ (Figura 43) y de la HAp:5 Dy³⁺ (Figura 44) presentan las transiciones típicas del Dy³⁺. Sin embargo, la forma de los picos y la dirección son diferentes, mientras que los picos de las transiciones de la HAp:0.5 Dy³⁺ se inclinan hacia la izquierda, en las transiciones de la HAp:5 Dy³⁺ ocurre un corrimiento y se inclinan hacia a la derecha. Asimismo, los picos de excitación de los espectros de la impurificación del 0.5% (Figura 41) presentan un corrimiento en longitudes de onda en comparación con los picos del espectro de la impurificación del 5% (Figura 42). Estas diferencias se deben a la concentración de Dy³⁺ utilizada para la impurificación de la hidroxiapatita.

La estructura $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ puede reescribirse como: $\text{Ca}(\text{I})_4\text{Ca}(\text{II})_6(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (E. J. D. Bronzino et al., 2000; Campa J. et al., 2007; Graeve et al., 2010; LeGeros et al., 2009). Esta estructura es muy estable y flexible, permite la sustitución de los átomos de Ca^{2+} que tienen un radio iónico de 1.12 Å por iones de Dy^{3+} con un radio iónico de 1.027 Å, ya que tienen radios iónicos muy similares. Cuando los átomos de calcio de la estructura son substituidos por Dy^{3+} , los grupos hidroxilo son transformados en iones óxido, para proveer una compensación de carga en la estructura $\text{Ca}_{10-x}\text{Dy}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-x}\text{O}_x$. La cantidad de iones que puede substituir a los átomos de calcio en la red depende del radio iónico y de la compensación de carga (Ardanova et al., 2010; Get'man et al., 2005; Y. Li et al., 2009). Por lo cual, las substituciones de los iones de Dy^{3+} tienen un límite en la red de la apatita y es diferente para cada ion substituyente. En el caso de los iones Dy^{3+} , el límite para mantener la fase hexagonal de la hidroxiapatita homogénea para las substituciones de iones Dy^{3+} es $x = 1.4$ (donde x representa la variación de fracción molar). Concentraciones superiores a $x = 1.4$ causan la formación de Dy_3PO_7 y DyPO_4 monoclinico (Get'man et al., 2005).

Respecto a la posición que ocupan los iones lantánidos en los distintos sitios de los átomos de calcio de la estructura hidroxiapatita: regularmente los átomos de $\text{Ca}(\text{II})$ son preferentemente substituidos por los iones lantánidos trivalentes que los $\text{Ca}(\text{I})$. En el caso del disprosio las substituciones de los $\text{Ca}(\text{II})$ son predominantes. Esto se asocia con la compensación de carga entre los enlaces de los Dy^{3+} con los O^{2-} ; con el menor número de coordinación de los $\text{Ca}(\text{II})$ en comparación de los $\text{Ca}(\text{I})$, con el aumento de la diferencia del radio iónico entre $\text{Ca}(\text{II})$ y Dy^{3+} y con una polarización superior de los Dy^{3+} en los sitios de los $\text{Ca}(\text{II})$ en comparación con los $\text{Ca}(\text{I})$ (Ardanova et al., 2010; Get'man et al., 2005; Y. Li et al., 2009).

En una impurificación de la hidroxiapatita con disprosio donde $x = 1.4$, los cuatro sitios de $\text{Ca}(\text{I})$ son ocupados por 0.132 iones de disprosio y por 3.868 de calcio, mientras que los seis sitios de $\text{Ca}(\text{II})$ son ocupados por 1.266 iones de disprosio y por 4.734 de calcio. La máxima cantidad de iones disprosio que aceptan los $\text{Ca}(\text{I})$ es 0.132 y los $\text{Ca}(\text{II})$ es 1.266

(Ardanova et al., 2010; Get'man et al., 2005). Cabe mencionar que la variación de fracción molar 1.4 de Dy^{3+} equivale a una impurificación de alrededor de 16.3%.

Con base en lo anterior, la impurificación de 5% de Dy^{3+} equivale a una de $x = 0.4716$. Donde alrededor del 90.248% del Dy^{3+} ocupa los sitios de los Ca(II) y sólo alrededor del 9.428% del Dy^{3+} ocupa los sitios de los Ca(I). Para esta impurificación de Dy^{3+} la ocupación total en los sitios de los Ca(I) y Ca(II) ocasiona que los espectros de emisión presenten un corrimiento e inclinación hacia longitudes de onda mayores.

Asimismo, otro efecto que presenta la impurificación del 5% de Dy^{3+} es una disminución en la intensidad relativa de emisión. Esto se debe a que porcentajes altos de impurificación ocasionan un proceso de relajación cruzada. Este proceso se presenta cuando un ión excitado transfiere parte de su energía a otro ión. Al aumentar la concentración de Dy^{3+} , la distancia entre estos iones disminuye, lo que incrementa los procesos de relajación cruzada y la consecuente disminución de los procesos radiativos (Lemanski y Deren, 2011; Nagpure et al., 2009; Song et al., 2011).

Los resultados reportados hasta el momento corresponden a las dos impurificaciones que presentaron mayor intensidad relativa de emisión. Sin embargo, se analizaron las propiedades luminiscentes para porcentajes de impurificación de Dy^{3+} de 0.5%, 1%, 2.5%, 5% y 10% utilizando todas las longitudes de excitación obtenidas que se pueden observar en la Figura 41 y Figura 42.

En la Figura 45 se puede observar el comportamiento de la intensidad de emisión de la HAp: Dy^{3+} en función de la impurificación y la longitud de onda, con un tratamiento térmico de 800 °C. Se puede observar claramente que la impurificación de 0.5% de Dy^{3+} es superior a las otras concentraciones de impurificación en las diferentes longitudes de onda de excitación. La longitud de onda de 350 nm es la más intensa para 0.5%. La segunda concentración de impurificación con una mayor intensidad de emisión a las diferentes

longitudes de onda de excitación es la de 5% de Dy^{3+} , donde de igual manera la longitud de excitación en la que la $HAp:Dy^{3+}$ es más intensa es alrededor de los 350 nm.

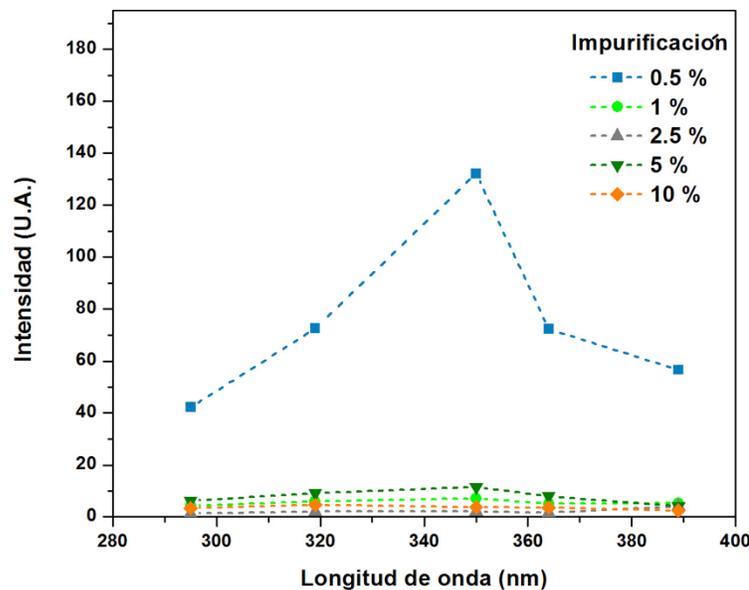


Figura 45. Comportamiento de la intensidad de la emisión de la $HAp:Dy^{3+}$ en función de la impurificación y la longitud de onda. Tratamiento térmico de 800 °C por 3 h.

En la Figura 46 se puede observar el comportamiento de la intensidad de emisión de la $HAp:Dy^{3+}$ en función de la impurificación y la longitud de onda, con un tratamiento térmico de 1000 °C. Se puede observar claramente que la impurificación de 0.5% de Dy^{3+} de la misma manera que con el tratamiento térmico de 800 °C (Figura 45) es superior a las otras concentraciones de impurificación y que la emisión en la longitud de onda de excitación de 350 nm es la más intensa en comparación con las otras longitudes de onda de excitación utilizadas. A 1000 °C la segunda impurificación que presenta emisiones más intensas a las diversas longitudes de onda de excitación es la impurificación de 1% y no la de 5% como en el caso del tratamiento de 800 °C (Figura 45). La impurificación de 5% de Dy^{3+} ahora ocupa el tercer lugar en las impurificaciones con emisiones más intensas.

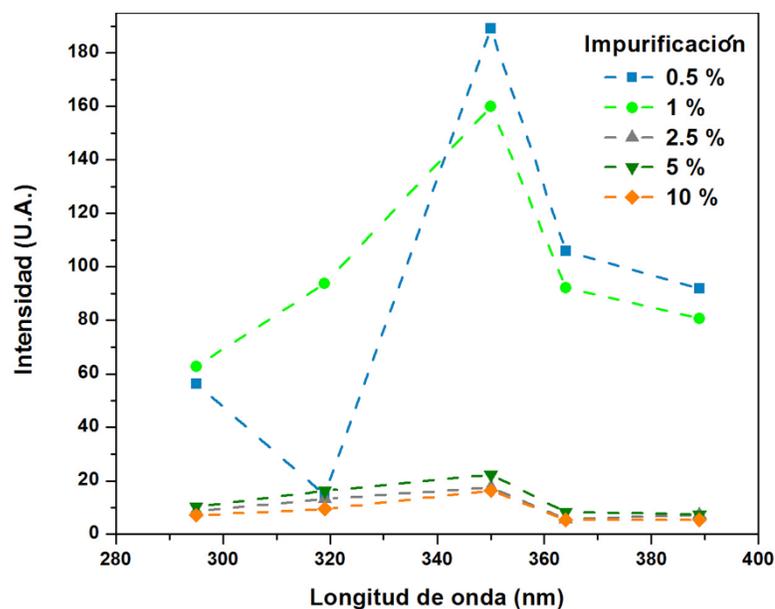


Figura 46. Comportamiento de la intensidad de la emisión de la HAp:Dy³⁺ en función de la impurificación y la longitud de onda. Tratamiento térmico de 1000 °C por 3 h.

La concentración de 1% de disprosio no permanece constante con los diversos tratamientos térmicos. Por esta razón, para realizar las pruebas de estabilidad, el comportamiento de la HAp:Dy³⁺ en fluidos y la funcionalización con albúmina sérica bovina, se seleccionaron: la concentración de 0.5% de Dy³⁺, que fue la más intensa en ambos tratamientos térmicos y la impurificación de 5% de Dy³⁺, que se mantiene constante como una de las concentraciones con emisiones relativas más intensas en el tratamiento térmico de 800 °C y 1000 °C.

La Figura 47 muestra los espectros de excitación y emisión de hidroxiapatita impurificada con 0.5% de disprosio (HAp:0.5 Dy³⁺) con un tratamiento térmico 800 °C y 1000 °C, utilizando una longitud de onda de emisión de 574 nm y una longitud de onda de excitación de 350 nm. Como se mencionó anteriormente, la diferencia en los tratamientos térmicos no afecta las transiciones de la HAp:Dy³⁺ y se puede observar que los espectros tanto de emisión como de excitación son muy similares a 800 °C y 1000 °C. Los espectros de emisión presentan cuatro picos de emisión correspondientes a las transiciones típicas del

Dy^{3+} . La primera transición ${}^4\text{F}_{9/2} \rightarrow {}^6\text{H}_{15/2}$ centrada en los 485 nm, la segunda transición ${}^4\text{F}_{9/2} \rightarrow {}^6\text{H}_{13/2}$ centrada en los 575 nm que es la más intensa, la tercera transición ${}^4\text{F}_{9/2} \rightarrow {}^7\text{H}_{11/2}$ centrada en los 660 nm y la cuarta transición ${}^4\text{F}_{9/2} \rightarrow {}^7\text{H}_{9/2}$ centrada en los 755 nm.

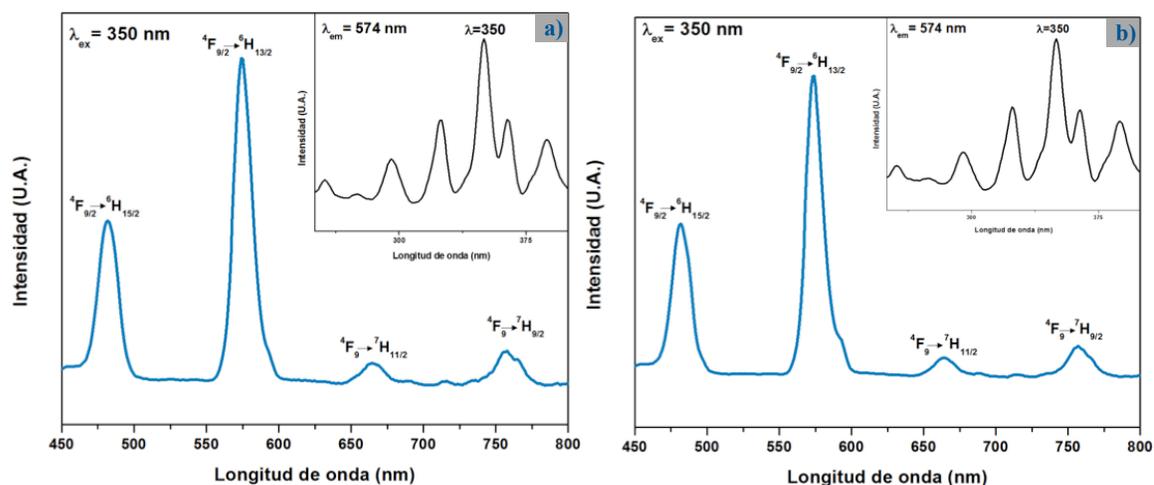


Figura 47. Espectros de excitación y emisión HAp:0.5 Dy³⁺. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. Emisión en $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm y excitación en $\lambda_{\text{em}} = 574$ nm.

La Figura 48 muestra los espectros de excitación y emisión de hidroxiapatita impurificada con 5% de disprosio (HAp:5 Dy³⁺) con un tratamiento térmico de 800 °C y 1000 °C, utilizando una longitud de onda de emisión de 592 nm y una longitud de onda de excitación de 341 nm. Los espectros de emisión presentan las 4 transiciones típicas del Dy³⁺ y el efecto de corrimiento de los picos de emisión.

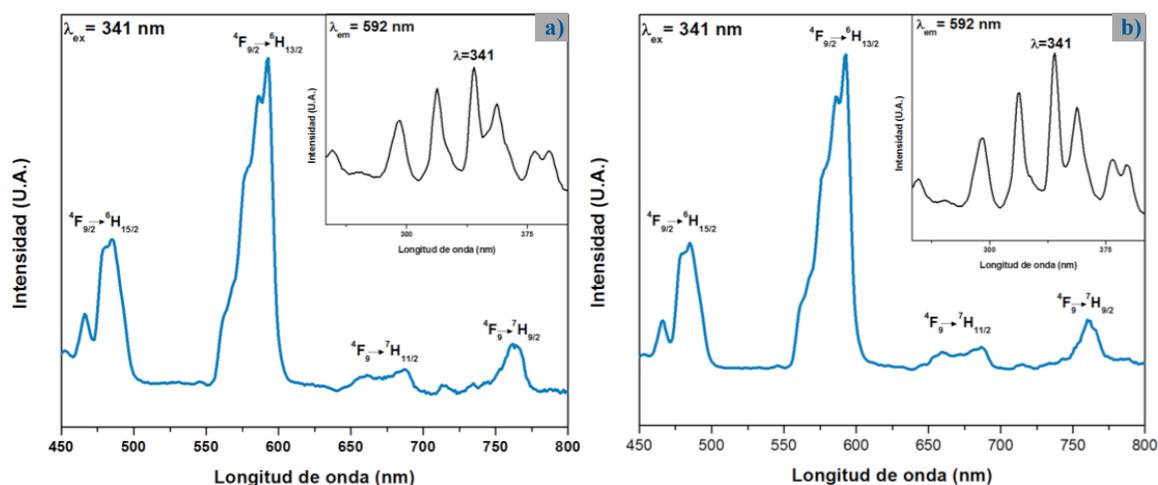


Figura 48. Espectros de excitación y emisión HAp:5 Dy³⁺. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. Emisión en $\lambda_{em} = 341$ nm y excitación en $\lambda_{ex} = 592$ nm.

V.6 Fotoluminiscencia: pruebas de estabilidad y comportamiento en fluidos

La hidroxiapatita impurificada con disprosio como una plataforma ideal para el desarrollo de teranósticos, debe ser capaz de mantener estable su estructura y sus propiedades luminiscentes en medios fisiológicos. En esta sección se reportan las mediciones de las propiedades fluorescentes de la hidroxiapatita impurificada con 0.5% y 5% de Dy³⁺ ya que fueron las que presentaron mayor intensidad en las propiedades fotoluminiscentes. Las muestras se analizaron inmersas en agua con diferentes valores de pH, orina y suero humano. La longitud de onda de excitación fue de 350 nm.

V.6.1 Fotoluminiscencia de HAp:Dy³⁺ en agua

La Figura 49 muestra los espectros de emisión de la HAp:0.5 Dy³⁺ inmersa en agua con diferentes valores de pH. La HAp:0.5 Dy³⁺ a 800 °C y 1000 °C muestran las cuatro transiciones típicas del Dy³⁺. Los espectros de emisión para el agua están en color negro.

Los espectros de emisión de la HAp:0.5 Dy³⁺ no se ven afectados por los pH de 3.5 (en rojo), 5.6 (en verde) y 10.5 (en azul). A 800 °C (Figura 49a) los espectros de emisión presentan cierto ruido, esto se debe a que la HAp:0.5 Dy³⁺ precipita demasiado rápido al fondo de la celda de cuarzo y la medición se ve afectada. A 1000 °C (Figura 49b) los espectros de emisión se ven muy claros y con picos bien definidos ya que las intensidades relativas de emisión son mayores.

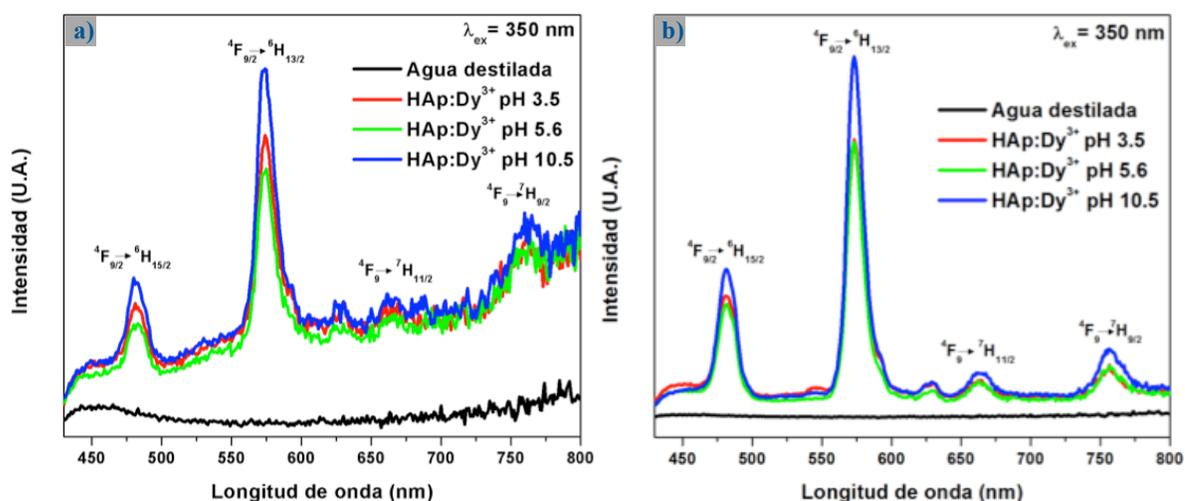


Figura 49. Espectros de emisión de HAp:0.5 Dy³⁺ en agua bajo diferentes pH. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$.

La Figura 50 muestra los espectros de emisión de la HAp:5 Dy³⁺ inmersa en agua con diferentes valores de pH. Los espectros de emisión muestran las cuatro transiciones típicas del Dy³⁺ y estas transiciones no se ven afectadas por los diferentes valores de pH de 3.5 (en rojo), 5.6 (en verde) y 10.5 (en azul). De igual manera que en la Figura 48, en los espectros se observa el efecto del corrimiento de los picos de emisión dado por las emisiones simultáneas de los Dy³⁺ en los Ca(I) y Ca(II) de la hidroxiapatita debido a la impurificación del 5%.

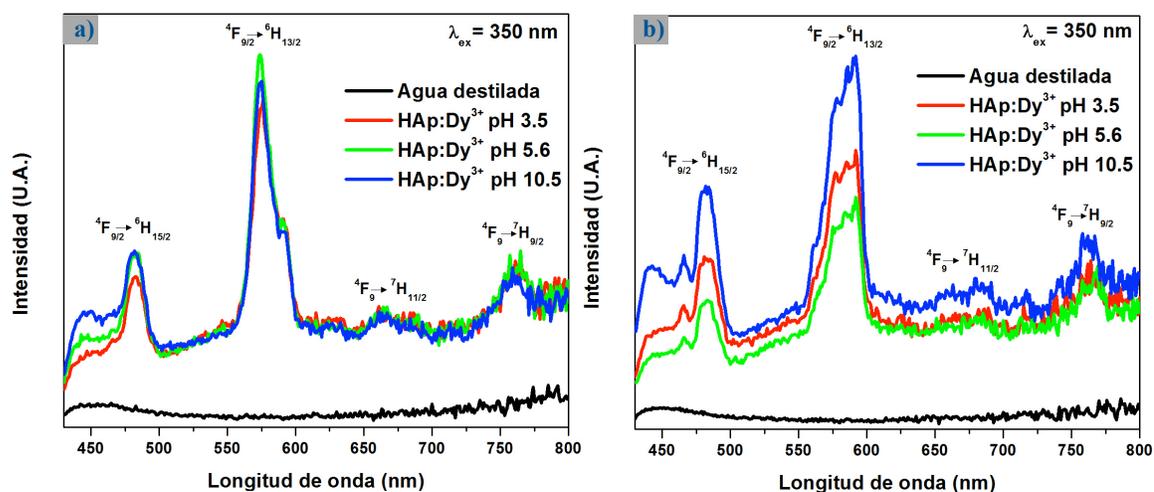


Figura 50. Espectros de emisión de HAp:0.5 Dy³⁺ en agua bajo diferentes valores de pH. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$.

Con la finalidad de conocer el comportamiento de las propiedades fotoluminescentes de las nanopartículas de HAp:Dy³⁺ inmersas en agua a un pH igual al del cuerpo humano y la estabilidad de las propiedades conforme aumentaba el tiempo de exposición. Las nanopartículas de HAp:Dy³⁺ fueron inmersas en agua con un pH de 7.2. La Figura 51 muestra los espectros de emisión de la HAp:Dy³⁺ con un tratamiento térmico de 800 °C, inmersas en agua por un período de 60 minutos utilizando una longitud de onda de excitación de 350 nm. La Figura 51a muestra la impurificación del 0.5% y se observa claramente picos de emisión bien definidos de las transiciones del Dy³⁺.

Los espectros de emisión de la Figura 51b correspondientes a la impurificación del 5% de Dy³⁺ presentan de la misma manera las transiciones, pero menos intensas y definidas en comparación con los espectros de emisión de la Figura 51a. Los espectros no parecen verse afectados por el aumento de tiempo en contacto con el agua.

Dado que los resultados de PL y XRD indicaron que los iones Dy³⁺ fueron incorporados exitosamente en la estructura cristalina de la Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, y dado que la hidroxiapatita biológica es muy estable a pH >4.2. Las nanopartículas de HAp:Dy³⁺ no se ven afectadas

por estar inmersas en agua a pH de 7.2 por un período de 60 minutos y se esperaría que se vean afectadas por periodos de tiempo más largos (Campa J. et al., 2007; Demirkiran et al., 2010).

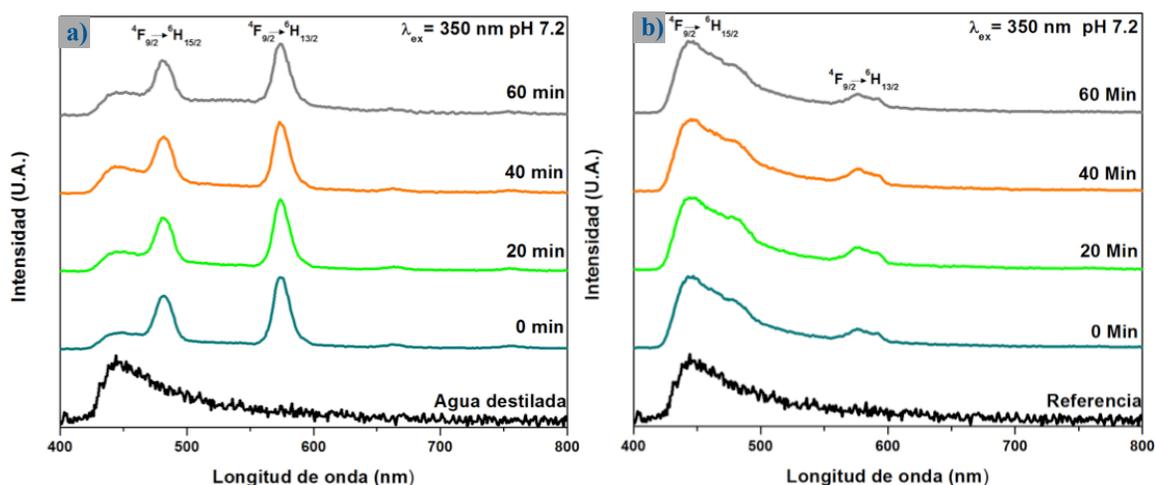


Figura 51. Espectros de la estabilidad de emisión de HAp:Dy³⁺ en agua a pH 7.2. Tratamiento térmico de 800 °C por 3 h. a) 0.5% de impurificación y b) 5% de impurificación. $\lambda_{ex}=350$ nm.

V.6.2 Fotoluminiscencia de HAp:Dy³⁺ en orina

La Figura 52 muestra los espectros de emisión de la HAp:0.5 Dy³⁺ inmersa en orina, utilizando una longitud de onda de excitación de 350 nm. Los espectros de emisión en color negro representan la orina sola y los espectros en verde la HAp:0.5 Dy³⁺ inmersa en orina. Debido a que la transición ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^6H_{15/2}$ centrada en los 485 nm es completamente opacada por el espectro de luminiscencia de la orina, la HAp:0.5 Dy³⁺ inmersa en orina presenta tres de las cuatro transiciones típicas del Dy³⁺. A 800 °C (Figura 52a) las transiciones del Dy³⁺ se ven opacadas por el espectro de luminiscencia de la orina y apenas se alcanzan a distinguir, en cambio a 1000 °C (Figura 52b) el pico de la transición ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^6H_{13/2}$ centrada en los 575 nm se define claramente. En ambos espectros la transición ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^7H_{9/2}$ centrada en los 755 nm se observa claramente ya que se encuentra más alejada del espectro de luminiscencia de la orina.

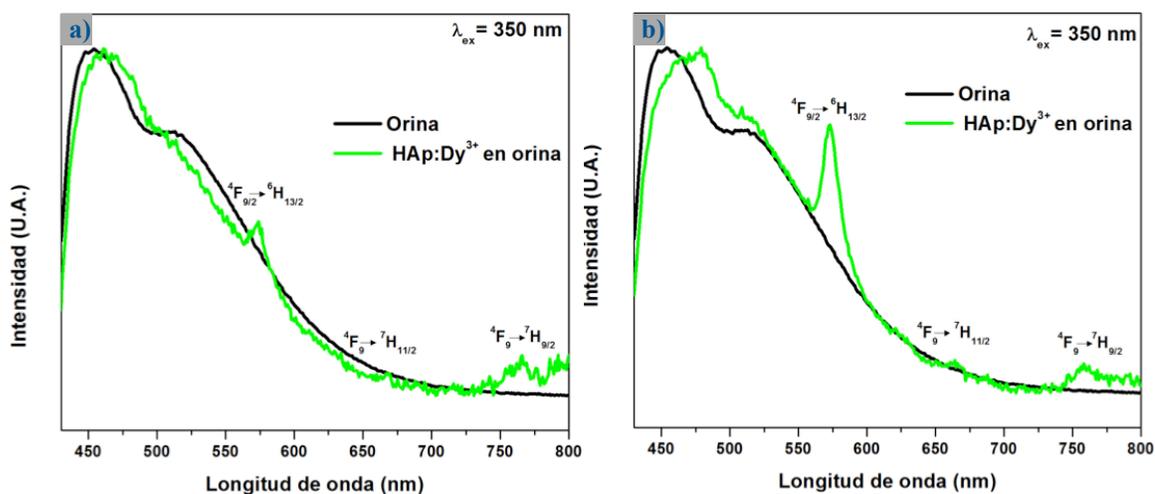


Figura 52. Espectro de emisión de HAp:0.5 Dy³⁺ en orina. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$.

La Figura 53 muestra los espectros de emisión de la HAp:5 Dy³⁺ inmersa en orina. Pero en comparación con los espectros de emisión de la Figura 52, en la impurificación del 5% de Dy³⁺ la otras tres transiciones apenas se alcanzan a distinguir ya que en su mayoría son opacados por el espectro de luminiscencia de la orina.

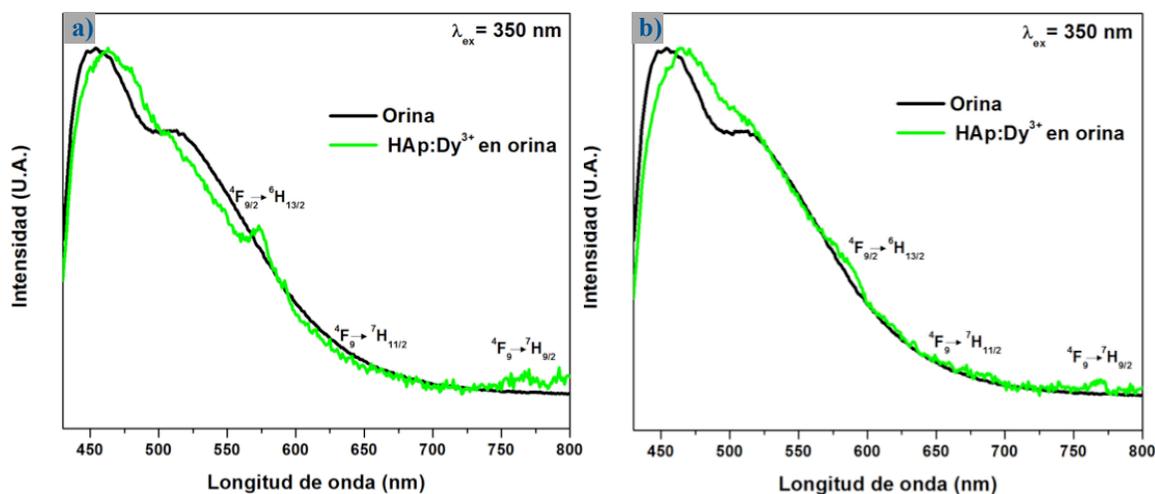


Figura 53. Espectro de emisión de HAp:5 Dy³⁺ en orina. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$.

La luminiscencia de la orina se debe a la interacción de los grupos funcionales $-H_2N$ de la urea con los cationes presentes en el organismo que se pueden ver en la Tabla VII. El máximo en el espectro de luminiscencia de la orina normal esta centrado en la región de 480 nm. Éste puede variar la ubicación del pico máximo y centrarse en 570 nm o en 670 nm dependiendo de los diferentes complejos formados entre la urea y las sales predominantes en la muestra de orina (Coté et al., 2008). La medición de los espectros de emisión de la HAp:Dy³⁺ se ven interferidos por los nuevos centros luminiscentes formados por la orina. Pero las propiedades luminiscentes de la HAp:Dy³⁺ se mantienen. Algunas de las posibles situaciones que podría ocurrir por el contacto prolongado de la HAp:Dy³⁺, aparte de la descomposición de la orina, sería la substitución de algunos iones en la estructura de la apatita tal como ocurre con la hidroxiapatita biológica.

V.6.3 Fotoluminiscencia de HAp:Dy³⁺ en suero sanguíneo

La Figura 54 muestra los espectros de emisión de la HAp:0.5 Dy³⁺ inmersa en suero sanguíneo, utilizando un longitud de excitación de 350 nm. Los espectros de emisión en color negro representan el suero y los espectros en azul la HAp:0.5 Dy³⁺ inmersa en suero. A 800 °C y 1000 °C tres de las cuatro transiciones del Dy³⁺ se ven opacadas por los espectro de emisión del suero, el pico de emisión de la transición $^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{13/2}$ centrada en los 575 nm se alcanza a distinguir completamente.

La HAp:0.5 Dy³⁺ inmersa en suero causa en corrimiento a la derecha en el pico de emisión del suero. El pico de emisión más intenso del suero se centra en 520 nm, cuando el material se encuentra inmerso en suero el pico de emisión se recorre 20 nm y se centran en la longitud de onda de los 540 nm.

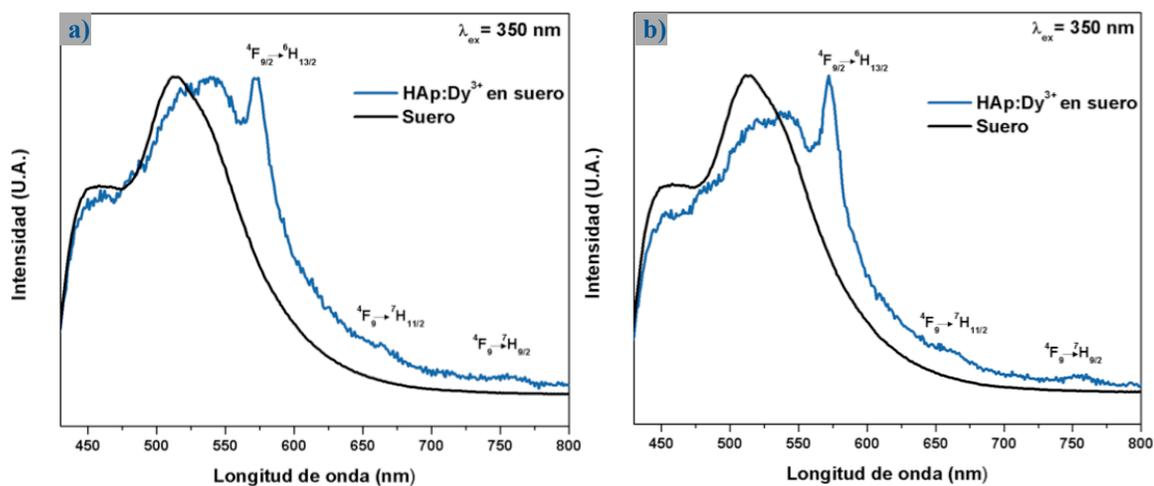


Figura 54. Espectros de emisión de HAp:0.5 Dy³⁺ en suero sanguíneo. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$.

La Figura 55 muestra los espectros de emisión de la HAp:5 Dy³⁺ inmersa en suero sanguíneo. A 800 °C y 1000 °C los espectros de emisión de la HAp:5 Dy³⁺ se ven completamente opacados por el espectro de emisión del suero.

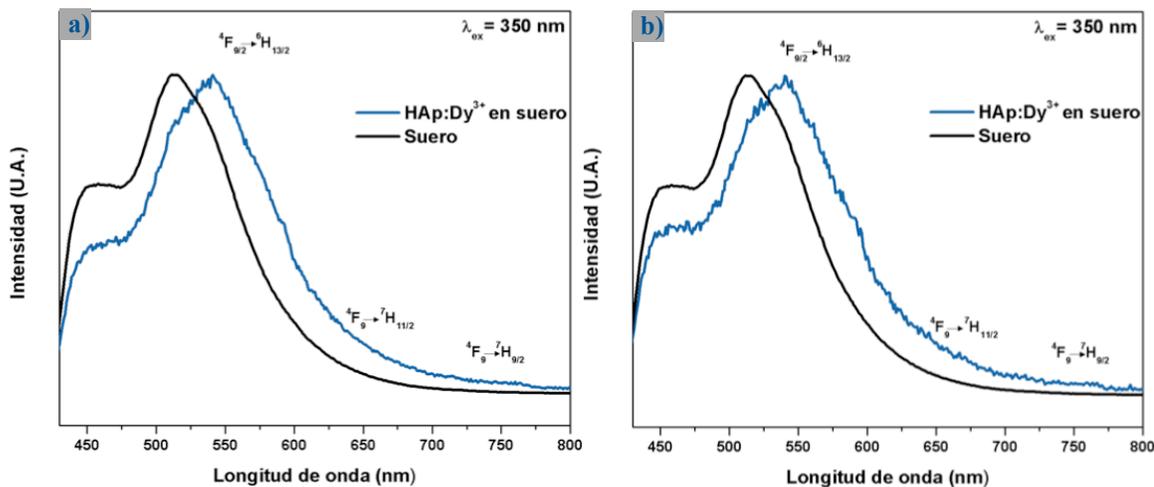


Figura 55. Espectros de emisión de HAp:5 Dy³⁺ en suero sanguíneo. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$.

La luminiscencia del suero está determinada por la estructura de las proteínas, las sustancias nitrogenadas no proteicas (urea, ácido úrico, creatina, creatinina, sales de amonio), y las sustancias nutritivas (glucosa, lípidos, aminoácidos) que lo componen. Además, por la posible formación de nuevos centros luminiscentes de la urea con los electrólitos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) que viajan por la sangre. Las propiedades luminiscentes de la HAp:Dy^{3+} inmersa en suero no deberían verse afectadas por los componentes del suero.

V.7 Espectroscopía infrarroja de la funcionalización de HAp:Dy^{3+} @BSA

La funcionalización de nanopartículas con péptidos o proteínas es un tópico importante en el desarrollo de nanopartículas multifuncionales que puedan funcionar como teranósticos. De las proteínas utilizadas para la funcionalización, la albúmina sérica bovina (BSA) es la más frecuente debido a que es la proteína más abundante del plasma sanguíneo, constituye del 54-58% de las proteínas totales del plasma, es la proteína que tiene mayores puntos de unión para medicamentos y otras sustancias fisiológicas, y puede ser fácilmente unida con otras proteínas, con marcadores fluorescentes o nanopartículas diversas (Misra et al., 2010; Peng et al., 2011; Ross y Pawlina, 2008).

En la funcionalización de las proteínas con nanopartículas, el pH juega un papel importante en la unión de las nanopartículas con el ligando y la proteína. La albúmina sérica bovina es una proteína que posee extremos hidrófilos (que es soluble en agua) y hidrófobos (que rechaza el agua) debido a la presencia de grupos NH_2 (polar) y COOH (apolar) en su estructura molecular. Esto ocasiona diferentes cargas netas de la molécula en medios con diferentes valores de pH. Específicamente tiene una carga positiva neta por debajo de su punto isoeléctrico de 4.8 y una carga negativa neta por encima de su pI (Misra et al., 2010; Peng et al., 2011).

Para corroborar funcionalización la HAp:Dy^{3+} y la albúmina, se llevó a cabo espectroscopía infrarroja (IR). La Figura 56 muestra los espectros de infrarrojo de la HAp:Dy^{3+} y la HAp:Dy^{3+} funcionalizada con albúmina sérica bovina ($\text{HAp:Dy}^{3+}@BSA$), impurificada con 0.5% y 5%, y sometidas a un tratamiento térmico de 800 °C. El espectro color negro representa la HAp:Dy^{3+} y el espectro azul la $\text{HAp:Dy}^{3+}@BSA$.

Los espectros de la $\text{HAp:Dy}^{3+}@BSA$ impurificada al 0.5% y 5% de Dy^{3+} muestran dos picos de transmitancia que no varían de posición en los dos diferentes espectros. Estos están relacionados con la estructura de la albúmina sérica bovina, el primero centrado en 1649 cm^{-1} que corresponde a la banda característica de la amida I, y el segundo centrado en 1544 cm^{-1} que corresponde a la banda de la amida II. La banda más intensa de transmitancia de la albúmina es la de la amida I y se asocia principalmente a las vibraciones del grupo carbonilo (C=O) del enlace peptídico y el patrón de enlaces del H. La banda de la amida II está relacionada con las vibraciones de los enlaces N-H, C-N y C-C de la estructura (Ferrer et al., 2008; Peng et al., 2011). Los resultados de espectroscopía IR de la Figura 56 corroboran la funcionalización de HAp:Dy^{3+} con albúmina sérica bovina.

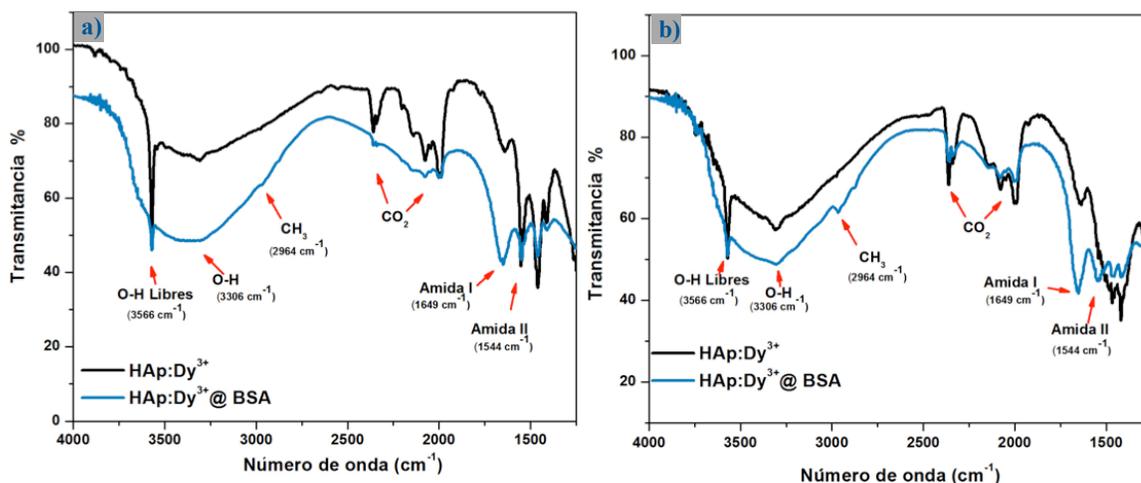


Figura 56. Espectro IR de HAp:Dy^{3+} y $\text{HAp:Dy}^{3+}@BSA$. Tratamiento térmico de 800 °C por 3 h. a) 0.5% de impurificación y b) 5% de impurificación.

V.8 Fotoluminiscencia de la funcionalización de HAp:Dy³⁺@BSA

La Figura 57 muestra los espectros de emisión de la HAp:0.5 Dy³⁺ funcionalizada con albúmina sérica bovina (HAp:0.5 Dy³⁺@BSA), utilizando una longitud de onda de excitación de 350 nm. Los espectros de emisión en color negro representan el agua y los espectros en azul la HAp:Dy³⁺@BSA inmersa en agua. A 800 °C y 1000 °C los espectros son muy similares y muestran picos de emisión bien definidos correspondientes a las 4 transiciones típicas del Dy³⁺.

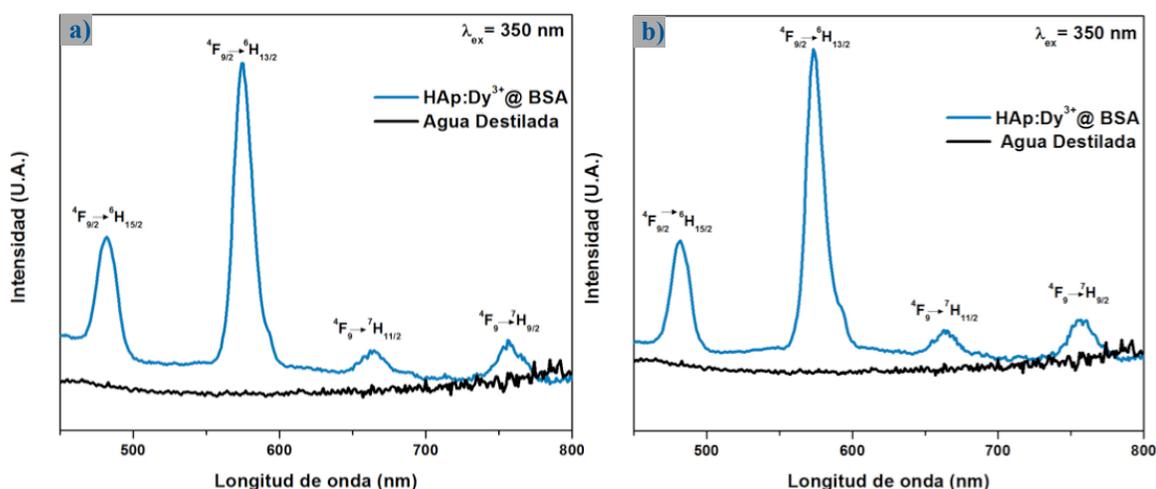


Figura 57. Espectros de emisión de HAp:0.5 Dy³⁺ funcionalizada con BSA. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. $\lambda_{ex} = 350$ nm.

La Figura 58 muestra los espectros de emisión de HAp:5 Dy³⁺@BSA. De la misma manera que la Figura 57 se observan las cuatro transiciones típicas del Dy³⁺.

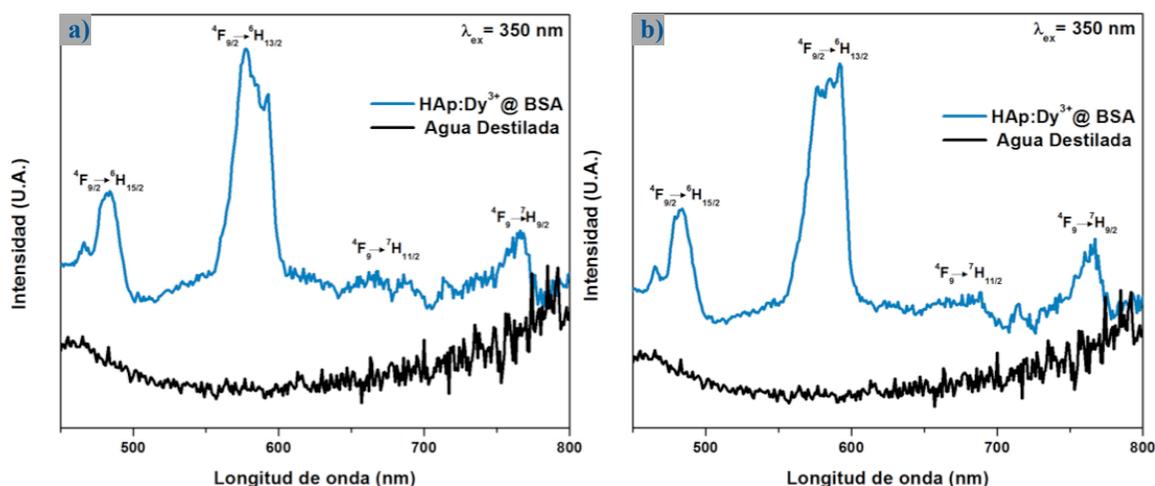


Figura 58. Espectros de emisión de HAp:5 Dy³⁺ funcionalizada con BSA. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. λ_{ex} = 350 nm.

V.9 Resumen

En resumen, la hidroxiapatita impurificada con disprosio (HAp:Dy³⁺) fue sintetizada por el método sol-gel asistido con ácido tartárico. Las impurificaciones de Dy³⁺ fueron de 0.5% y 5%. El material fue sometido a tratamientos térmicos de 800 °C y de 1000 °C por 3 h.

- Los resultados de difracción de rayos X (XRD) demostraron que los productos finales fueron la fase hexagonal de la hidroxiapatita, homogénea con el tratamiento térmico de 800 °C, y la formación de la fase hexagonal de la hidroxiapatita con trazas de la fase de β -Ca₃(PO₄)₂ con el tratamiento térmico de 1000 °C. Asimismo, se observó que los iones de Dy³⁺ fueron incorporados exitosamente en la estructura cristalina de la Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂.
- Los resultados de microscopía electrónica de barrido (SEM) mostraron la obtención de polvos en forma de láminas agregadas con poros en su superficie.

- Los resultados de espectroscopía de Dispersión de Energía (EDS) confirmaron la presencia de calcio, oxígeno y fósforo para el caso de la impurificación del 0.5%, y de calcio, oxígeno, fósforo y disprosio para el caso de la impurificación del 5%.
- Los resultados de microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostraron la obtención de nanopartículas uniformes y porosas con diámetros desde los 50 nm a los 200 nm aglomeradas con un tratamiento térmico de 800 °C . A 1000 °C mostraron la obtención de partículas uniformes de un intervalo de diámetro de entre 200 nm y 1000 nm altamente aglomeradas y con cristales fusionados. Tras la separación de nanopartículas que fueron sometidas a un tratamiento térmico de 800 °C , mediante ultrasonido y filtrado al vacío las nanopartículas se lograron separar un poco pero se siguió presentando la aglomeración.
- Los resultados de fotoluminiscencia (PL) demostraron que los espectros de excitación corresponden a las transiciones electrónicas de la nivel $4f^9$ del Dy^{3+} . Asimismo, la obtención de cuatro picos de emisión correspondientes a las transiciones típicas del Dy^{3+} . La primera transición ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^6H_{15/2}$ centrada en los 485 nm, la segunda transición ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^6H_{13/2}$ centrada en los 575 nm, la tercera transición ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^7H_{11/2}$ centrada en los 660 nm y la cuarta transición ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^7H_{9/2}$ centrada en los 755 nm. Los dos distintos tratamientos térmicos de 800 °C y 1000 °C no afectaron las transiciones de emisión del material.
- La concentración de impurificación de Dy^{3+} que mostró propiedades fluorescentes superiores fue la de 0.5%, seguida de la impurificación de 5%. La longitud de excitación en la cual el material presentó propiedades fluorescentes superiores a las diferentes impurificaciones fue alrededor de los 350 nm. Las diferencias y el corrimiento en los espectros de emisión de la impurificación del 5% son la combinación de las absorciones y emisiones de los iones de disprosio que substituyen los sitios de los Ca(I) y los Ca(II) de la estructura de la

hidroxiapatita. Asimismo, otro efecto que presenta la impurificación del 5% de Dy^{3+} es una disminución en la intensidad relativa de las muestras. Esto se debe que la con esa cantidad de impurificación de Dy^{3+} ocurre un proceso de relajación cruzada.

- Los resultados de espectroscopía infrarroja (IR) demostraron la presencia de las bandas de la amida I y II lo que corroboró la funcionalización de HAp:Dy^{3+} con albúmina sérica bovina.
- Finalmente, los resultados de los espectros de emisión de la HAp:Dy^{3+} inmersa en fluidos y la $\text{HAp:Dy}^{3+}@BSA$ inmersa en agua, que se observan en las figuras 59 y 60, muestran las transiciones típicas del Dy^{3+} . Los resultados demostraron que la estructura y las propiedades luminiscentes de la HAp:Dy^{3+} no se ven afectadas por la interacción con los diversos fluidos. Los resultados obtenidos demuestran que la Hidroxiapatita impurificada con disprosio podría funcionar como una plataforma ideal para el desarrollo de teranósticos.

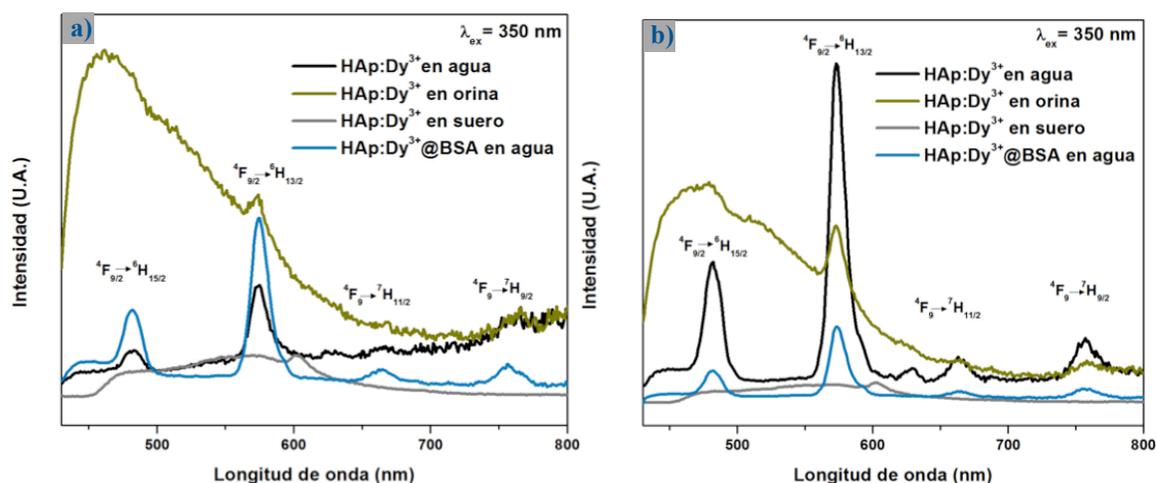


Figura 59. Espectros de emisión de HAp:0.5 Dy^{3+} en fluidos. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$.

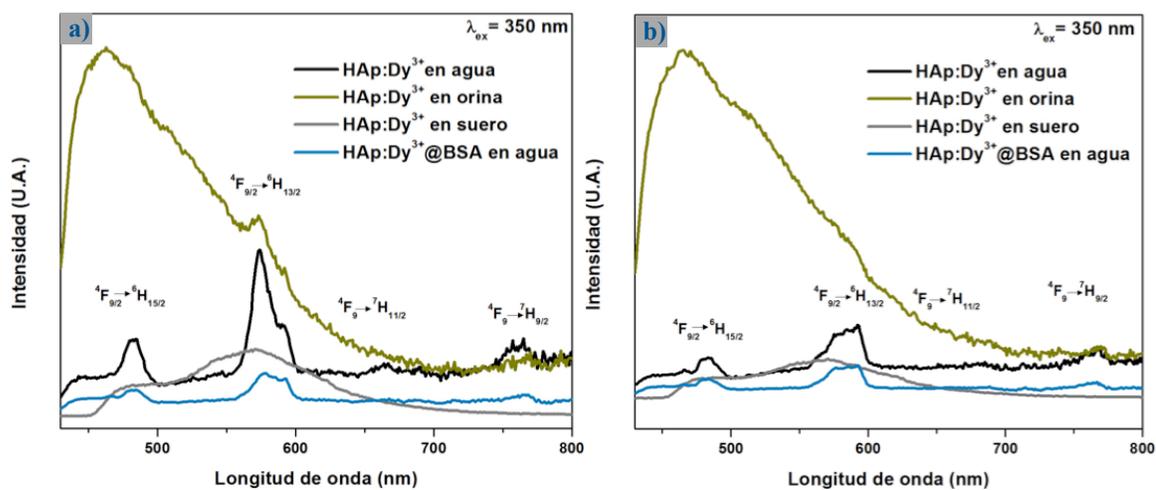


Figura 60. Espectros de emisión de HAp:5 Dy³⁺ en fluidos. a) 800 °C por 3 h y b) 1000 °C por 3 h. $\lambda_{ex} = 350$ nm.

Conclusiones

- Nanopartículas de hidroxiapatita impurificada con diferentes concentraciones de disprosio fueron exitosamente sintetizadas por el método sol-gel asistido con ácido tartárico.
- Los iones de Dy^{3+} fueron incorporados exitosamente en la red cristalina de la hidroxiapatita.
- Se obtuvieron nanopartículas ≤ 100 nm con el tratamiento térmico de 800 °C.
- La HAp: Dy^{3+} mostró la presencia de cuatro picos de emisión correspondientes a las transiciones típicas del Dy^{3+} . Lo que es una indicación clara de que el Dy^{3+} actúa como centro luminiscente en la estructura.
- La concentración de impurificación de Dy^{3+} en la cual la HAp: Dy^{3+} presentó propiedades fluorescentes superiores fue del 0.5%.
- Las propiedades luminiscentes de la HAp: Dy^{3+} inmersa en fluidos no se ven afectadas.
- La HAp: Dy^{3+} permanece estable en medios con valores diferentes de pH.
- Las nanopartículas de HAp: Dy^{3+} fueron exitosamente funcionalizadas con albúmina sérica bovina.
- Las nanopartículas de HAp: Dy^{3+} podrían funcionar como una plataforma ideal para el desarrollo de teranósticos.

- Investigaciones futuras requieren solucionar los problemas de la aglomeración y la obtención de nanopartículas con tamaños similares. Una vez solucionados estos problemas, se requiere realizar pruebas de detección, transporte y liberación en sistemas biológicos.

Referencias

- Ai, H. (2011). Layer-by-layer capsules for magnetic resonance imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(9), 772–788. doi:10.1016/j.addr.2011.03.013
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., et al. (2006). *Introducción a la biología celular* (2da ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Allinger, N. L., Granados, R., Meléndez, E., y Sánchez, V. (1984). *Química orgánica* (2da ed.). Barcelona: Reverté.
- Ardanova, L. I., Get'man, E. I., Loboda, S. N., Prisedsky, V. V, Tkachenko, T. V, Marchenko, V. I., Antonovich, V. P., et al. (2010). Isomorphous substitutions of rare earth elements for calcium in synthetic hydroxyapatites. *Inorganic chemistry*, 49(22), 10687–93. doi:10.1021/ic1015127
- Atkins, P., y Jones, L. (2006). *Principios de química: los caminos del descubrimiento* (3ra ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Bailey, P. S., y Bailey, C. A. (1998). *Química orgánica conceptos y aplicaciones* (p. 618). Pearson education.
- Balamurugan, a., Balossier, G., Torres, P., Michel, J., y Ferreira, J. M. F. (2009). Sol–gel synthesis and spectrometric structural evaluation of strontium substituted hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering: C*, 29(3), 1006–1009. doi:10.1016/j.msec.2008.09.005
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., y Stryer, L. (2007). *Biochemistry* (6ta ed.). New York: W.H. Freeman and Company.
- Bhat, S. V. (2005). *Biomaterials* (2nd editio.). Mumbai, India: Alpha Science International, Ltd.
- Blasse, G., y Grabmaier, B. C. (1994). *Luminescent materials* (p. x, 232 p.). Berlin ; New York: Springer-Verlag.
- Bloomfield, V. (1966). The Structure of Bovine Serum Albumin at Low pH. *Biochemistry*, 5(2), 684–689. doi:10.1021/bi00866a039

- Branda, F. (2011). The sol-gel route to nanocomposites. In B. Reddy (Ed.), *Advances in nanocomposites - synthesis, characterization and industrial applications* (pp. 323–340). intech.
- Brinker, C. J., y Scherer, G. W. (1990). *Sol-gel science : the physics and chemistry of sol-gel processing* (p. xiv, 908 p.). Boston: Academic Press.
- Bronzino, E. J. D. (2000). Billotte, W. G. “Ceramic Biomaterials.”
- Bronzino, E. J. D., Raton, B., y Press, C. R. C. (2000). *The Biomedical Engineering Handbook , Second Edition .*
- Bronzino, J. D. (2000). *The biomedical engineering handbook. The electrical engineering handbook series* (2nd ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Burns, R. A. (2003). *Fundamentos de Química* (p. 784). México: Pearson educación.
- Campa J., Ulloa G. S., Galindo L.B., Belío I. A., Velazquez R., y M., R. E. (2007). *Biomateriales. Fundamentos, técnicas y aplicaciones* (1ra ed., p. 127). Guadalajara: Universidad de Guadalajara.
- Cao, G. (2004). *Nanostructures y nanomaterials : synthesis, properties y applications* (p. xiv, 433 p.). London ; Hackensack, NJ: Imperial College Press. Retrieved from Table of contents only <http://www.loc.gov/catdir/toc/fy1001/2008276278.html>
- Cartmell, E., y Fowles, G. W. A. (2003). *Valencia y estructura molecular* (3ra ed.). Barcelona: Reverté.
- Castro, S. (2012). La nanotecnología y sus aplicaciones en biomedicina. *Gaceta Ensenada UNAM*, p. 1. Ensenada: Universidad Autónoma de México.
- Ceccotti, E. L., y Sforza, R. (2007). *El diagnóstico en clínica estomatológica* (1ra .). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Christen, H. R. (1986). *Fundamentos de química general e inorgánica*. Barcelona: Reverté.
- Ciobanu, C. S., Massuyeau, F., Constantin, L. V., y Predoi, D. (2011). Structural and physical properties of antibacterial Ag-doped nano-hydroxyapatite synthesized at 100°C. *Nanoscale research letters*, 6(1), 613. doi:10.1186/1556-276X-6-613
- Clark, D. P., y Pazdernik, N. J. (2012). *Biotechnology : academic cell update* (Update., p. xv, 750 p.). Amsterdam ; Boston: Academic Cell Press.

- Conzone, S. D., y Day, D. E. (2009). Preparation and properties of porous microspheres made from borate glass. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 88A(2), 531–542. doi:10.1002/jbm.a.31883
- Cortes, H. F., Martínez, P. N., y Valencia, H. A. (2006). *Fundamentos de cristalografía*. Colombia: Elizcom.
- Coté, G. L., Bordun, O., Drobchak, O., y Priezzhev, A. V. (2008). Photoluminescence of urine salts, 6863, 68630N–68630N–5. doi:10.1117/12.760375
- Demirkiran, H., Mohandas, A., y Dohi, M. (2010). Bioactivity and mineralization of hydroxyapatite with bioglass as sintering aid and bioceramics with Na₃Ca₆(PO₄)₅ and Ca₅(PO₄)₂SiO₄ in a silicate matrix. *Materials science y ...*, 30(2), 263–272. doi:10.1016/j.msec.2009.10.011
- Devlin, T. M. (2004). *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas* (4ta ed.). Barcelona: Reverté.
- Enghag, P. (2007). Scandium, Yttrium, Lanthanum and the 14 Lanthanides–Rare Earth Metals (REMs). *Encyclopedia of the Elements: Technical Data- ...*, 373–492. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527612338.ch17/summary>
- Fernández, J. M. (2003). *El vidrio* (3ra ed.). Madrid: Consejo superior de investigaciones científicas sociedad española de cerámicas y vidrio.
- Ferrer, E. G., Bosch, A., Yantorno, O., y Baran, E. J. (2008). A spectroscopy approach for the study of the interactions of bioactive vanadium species with bovine serum albumin. *Bioorganic y medicinal chemistry*, 16(7), 3878–86. doi:10.1016/j.bmc.2008.01.060
- Fitzgerald, R. H., Kaufer, H., y Malkani, A. L. (2004). *Ortopedia, Volume 1* (p. 1142). Ed. Médica Panamericana. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=z0duOA9ZzBQCypgis=1>
- Ford, L., y Freedman, R. A. (2005). *Física universitaria: con física moderna* (Vol. 2, p. 713). México: Pearson educación.
- Freifelder, D. (2003). *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. Barcelona: Reverté.
- Fuentes, X., Castiñeiras, M. J., y Queraltó, J. M. (1998a). *Bioquímica clínica y patología molecular* (2da ed., Vol. 2). Barcelona: Reverté.

- Fuentes, X., Castiñeiras, M. J., y Queraltó, J. M. (1998b). *Bioquímica clínica y patología molecular* (2da ed., Vol. 1). Barcelona: Reverté.
- Gai, S., Yang, P., Li, X., Li, C., Wang, D., Dai, Y., y Lin, J. (2011). Monodisperse CeF₃, CeF₃:Tb³⁺, and CeF₃:Tb³⁺@LaF₃ core/shell nanocrystals: synthesis and luminescent properties. *Journal of Materials Chemistry*, 21(38), 14610–14615. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1039/C1JM12419F>
- Ganjali, M R, Zare-Dorabei, R., y Norouzi, P. (2009). Design and construction of a novel optical sensor for determination of trace amounts of dysprosium ion. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 143(1), 233–238. doi:10.1016/j.snb.2009.09.014
- Ganjali, Mohammad Reza, Gupta, V. K., Hosseini, M., Hariri, M., Faridbod, F., y Norouzi, P. (2012). Lanthanide recognition: A dysprosium(III) selective fluorimetric bulk optode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 171-172, 644–651. doi:10.1016/j.snb.2012.05.048
- Get'man, E. I., Loboda, S. N., Tkachenko, T. V., Ignatov, A. V., y Zabirk, T. F. (2005). Substitution of calcium with neodymium and dysprosium in hydroxyapatite structure. *Functional materials*, 12(1), 6–10.
- Graeve, O. A., Kanakala, R., Madadi, A., Williams, B. C., y Glass, K. C. (2010). Luminescence variations in hydroxyapatites doped with Eu²⁺ and Eu³⁺ ions. *Biomaterials*, 31(15), 4259–4267. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.02.009
- Harris, D. C. (2007). *Análisis químico cuantitativo* (3ra ed.). Barcelona: Reverté.
- He, W., Kjellin, P., Currie, F., y Handa, P. (2011). Formation of Bone-like Nanocrystalline Apatite Using Self-Assembled Liquid Crystals. *Chemistry of ...*, 892–902. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm201077t>
- 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
- Hermanson, G. T. (2010). *Bioconjugate Techniques (Google eBook)* (p. 1323). Academic Press. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=alooWMkRMk0Cypgis=1>
- Hirayama, K., Akashi, S., Furuya, M., y Fukuhara, K. (1990). Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and frit-FAB LC/MS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173(2), 639–646. doi:10.1016/S0006-291X(05)80083-X

- Hoenderdaal, S., Tercero Espinoza, L., Marscheider-Weidemann, F., y Graus, W. (2013). Can a dysprosium shortage threaten green energy technologies? *Energy*, 49, 344–355. doi:10.1016/j.energy.2012.10.043
- Hollinger, J. O. (2012). *An introduction to biomaterials. Biomedical engineering series* (2nd ed., p. xix, 624 p.). Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor y Francis.
- Hou, Z., Li, C., Ma, P., Li, G., Cheng, Z., Peng, C., Yang, D., et al. (2011). Electrospinning Preparation and Drug-Delivery Properties of an Up-conversion Luminescent Porous NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺@Silica Fiber Nanocomposite. *Advanced Functional Materials*, 21(12), 2356–2365. doi:10.1002/adfm.201100193
- Hou, Z., Yang, P., Lian, H., Wang, L., Zhang, C., Li, C., Chai, R., et al. (2009). Multifunctional hydroxyapatite nanofibers and microbelts as drug carriers. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 15(28), 6973–82. doi:10.1002/chem.200900269
- Huang, H.-C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S. K., y Rege, K. (2011). Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 155(3), 344–57. doi:10.1016/j.jconrel.2011.06.004
- Janib, S. M., Moses, A. S., y MacKay, J. A. (2010). Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, 62(11), 1052–63. doi:10.1016/j.addr.2010.08.004
- Janowski, M., Bulte, J. W. M., y Walczak, P. (2012). Personalized nanomedicine advancements for stem cell tracking. *Advanced drug delivery reviews*, 64(13), 1488–507. doi:10.1016/j.addr.2012.07.008
- Kattel, K., Park, J. Y., Xu, W., Kim, H. G., Lee, E. J., Bony, B. A., Heo, W. C., et al. (2012). Paramagnetic dysprosium oxide nanoparticles and dysprosium hydroxide nanorods as T₂ MRI contrast agents. *Biomaterials*, 33(11), 3254–61. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.01.008
- Koolman, J., y Röhm, K.-H. (2004). *Bioquímica: texto y atlas* (3ra ed.). Madrid: Médica Panamericana.
- Kuriakose, T. A., Kalkura, S. N., Palanichamy, M., Arivuoli, D., Dierks, K., Bocelli, G., y Betzel, C. (2004). Synthesis of stoichiometric nano crystalline hydroxyapatite by ethanol-based sol–gel technique at low temperature. *Journal of Crystal Growth*, 263(1-4), 517–523. doi:10.1016/j.jcrysgro.2003.11.057

- LeGeros, R., Ito, A., y Ishikawa, K. (2009). Fundamentals of hydroxyapatite and related calcium phosphates. *Advanced Biomaterials: Fundamentals, Processing, and Applications* (pp. 19–52). The American Ceramic Society. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470891315.ch2/summary>
- Lemanski, K., y Deren, P. (2011). Luminescent properties of dysprosium (III) ions in LaAlO₃ nanocrystallites. *Journal of Rare Earths*, 29(12), 1195–1197. doi:10.1016/S1002-0721(10)60625-4
- Li, L., Liu, Y., Tao, J., Zhang, M., Pan, H., Xu, X., y Tang, R. (2008). Surface Modification of Hydroxyapatite Nanocrystallite by a Small Amount of Terbium Provides a Biocompatible Fluorescent Probe. *Journal of Physical Chemistry C*, 112(32), 12219–12224. doi:10.1021/jp8026463
- Li, Y., Ooi, C. P., Philip Hong Ning, C., y Aik Khor, K. (2009). Synthesis and Characterization of Neodymium(III) and Gadolinium(III)-Substituted Hydroxyapatite as Biomaterials. *International Journal of Applied Ceramic Technology*, 6(4), 501–512. doi:10.1111/j.1744-7402.2008.02293.x
- Li, Z. Y., Lam, W. M., Yang, C., Xu, B., Ni, G. X., Abbah, S. A., Cheung, K. M. C., et al. (2007). Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. *Biomaterials*, 28(7), 1452–60. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.001
- Liu, D. M., Troczynski, T., y Tseng, W. J. (2001). Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: process development. *Biomaterials*, 22(13), 1721–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11396875>
- Liu, H., Chen, F., Xi, P., Chen, B., Huang, L., Cheng, J., Shao, C., et al. (2011). Biocompatible Fluorescent Hydroxyapatite: Synthesis and Live Cell Imaging Applications. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(38), 18538–18544. doi:10.1021/jp206843w
- Madhukumar, K., Varma, H. K., Komath, M., Elias, T. S., Padmanabhan, V., y Nair, C. M. K. (2007). Photoluminescence and thermoluminescence properties of tricalcium phosphate phosphors doped with dysprosium and europium. *Bulletin of Materials Science*, 30(5), 527–534. doi:10.1007/s12034-007-0082-x
- Mallick, B., Balke, B., Felser, C., y Mudring, A.-V. (2008). Dysprosium room-temperature ionic liquids with strong luminescence and response to magnetic fields. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 47(40), 7635–8. doi:10.1002/anie.200802390
- Martí, F. B., Conde, F. L., Jimeno, S. A., y Méndez, J. H. (2008). *Química analítica cualitativa* (18th ed.). Madrid: Paraninfo .

- McMurry, J., y Cervantes, S. R. (2008). *Química orgánica* (7ta ed.). México D.F.: Cengage learning.
- Misra, T. K., Huang, K. P., y Liu, C. Y. (2010). Bioconjugation of 32-macrocyclic polyammonium cations-functionalized gold nanoparticles with BSA. *J Colloid Interface Sci*, 344(1), 137–143. doi:10.1016/j.jcis.2009.12.031
- Mooney, J. B., y Barrancos, P. J. (2006). *Operatoria dental: integración clínica* (p. 1345). Ed. Médica Panamericana. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=zDFxeYR8QWwCypgis=1>
- Nagpure, I. M., Saha, S., y Dhoble, S. J. (2009). Photoluminescence and thermoluminescence characterization of Eu³⁺- and Dy³⁺-activated Ca₃(PO₄)₂ phosphor. *Journal of Luminescence*, 129(9), 898–905. doi:10.1016/j.jlumin.2009.03.034
- Nakashima, K., Takami, M., Ohta, M., Yasue, T., y Yamauchi, J. (2005). Thermoluminescence mechanism of dysprosium-doped β-tricalcium phosphate phosphor. *Journal of Luminescence*, 111(1-2), 113–120. doi:10.1016/j.jlumin.2004.07.002
- Nam, J., Won, N., Bang, J., Jin, H., Park, J., Jung, S., Jung, S., et al. (2012). Surface engineering of inorganic nanoparticles for imaging and therapy. *Advanced drug delivery reviews*. doi:10.1016/j.addr.2012.08.015
- Nelson, D. L., Cox, M. M., y Lehninger, A. L. (2008). *Lehninger principles of biochemistry* (5th ed., pp. xxix, 1158 p., p. G1–G17, C1–C8, A1–A4, AS1–AS35,). New York ; Basingstoke: W.H. Freeman.
- Ortega, C., Cerutti, S., Olsina, R. A., Martínez, L. D., y Silva, M. F. (2004). Simultaneous determination of dysprosium and iron in urine by capillary zone electrophoresis coupled to cloud point extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(4), 721–727. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2004.08.027
- Ouenzer, R. El, y Piriou, B. (1999). Spectroscopic study of Eu³⁺ in strontium hydroxyapatite Sr (PO) (OH), 85, 71–77.
- Pavan, B., Ceresoli, D., Tecklenburg, M. M. J., y Fornari, M. (2012). First principles NMR study of fluorapatite under pressure. *Solid state nuclear magnetic resonance*, 45-46(null), 59–65. doi:10.1016/j.ssnmr.2012.06.002
- Peng, X., Yao, D., Pan, Y., Yu, Q., Ni, S., Bian, H., Huang, F., et al. (2011). Study on the structural changes of bovine serum albumin with effects on polydatin binding by a

multitechnique approach. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 81(1), 209–14. doi:10.1016/j.saa.2011.06.003

- Peña, L. de la. (2004). *Cien años en la vida de la luz* (p. 143). México, D.F.: Fondo de cultura económica.
- Picado, A. B., y Álvarez, M. (2008). *Química I: Introducción al estudio de la materia* (p. 540). San José: Universidad estatal a distancia.
- Pierre, A. C. (1998). *Introduction to sol-gel processing. The Kluwer international series in sol-gel processing* (p. x, 394 p.). Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Rai, P., Mallidi, S., Zheng, X., Rahmzadeh, R., Mir, Y., Elrington, S., Khurshid, A., et al. (2010). Development and applications of photo-triggered theranostic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(11), 1094–1124. doi:10.1016/j.addr.2010.09.002
- Ratner, B. D. (1996). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine* (p. xi, 484 p.). San Diego: Academic Press.
- Rodríguez, M. J., y Sánchez, L. (2005). *Química: un proyecto de la American Chemical Society*. Barcelona: Reverté.
- Ross, M. H., y Pawlina, W. (2008). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular* (5ta ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Serway, R., y Jewett, J. (2004). *Física II texto basado en cálculo* (3ra ed.). México, D.F.: International Thomson editores.
- Shinde, K. N., Dhoble, S. J., y Kumar, A. (2011). Synthesis of novel Dy³⁺ activated phosphate phosphors for NUV excited LED. *Journal of Luminescence*, 131(5), 931–937. doi:10.1016/j.jlumin.2010.12.026
- Shriver, D. F., Atkins, P. W., y Langford, C. H. (2004). *Química inorgánica* (Vol. 2). Barcelona: Reverté.
- Silva, C. C., Filho, F. P., Sombra, a S. B., Rosa, I. L. V, Leite, E. R., Longo, E., y Varela, J. a. (2008). Study of structural and photoluminescent properties of Ca₈Eu₂(PO₄)₆O₂. *Journal of fluorescence*, 18(2), 253–9. doi:10.1007/s10895-007-0242-9
- Sircar, S. (2008). *Principles of Medical Physiology*. New York: Thieme.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., y Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis instrumental*. México, D.F.: Gengage learning.

- Skoog, D. A., West, D. M., y Holler, F. J. (2001). *Fundamentos de química analítica* (4ta ed., Vol. 2). Barcelona: Reverté.
- Song, Y., Guo, N., y You, H. (2011). Synthesis and Luminescent Properties of Cerium-, Terbium-, or Dysprosium-Doped Gd₄Si₂O₇N₂ Materials. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2011(14), 2327–2332. doi:10.1002/ejic.201001150
- Steinfeldt, M. (2007). *Nanotechnologies, hazards, and resource efficiency : a three-tiered approach to assessing the implications of nanotechnology and influencing its development* (p. xiii, 271 p.). Berlin ; New York: Springer. Retrieved from <http://www.loc.gov/catdir/toc/fy0716/2007931200.html>
- Strasinger, S. K., y Schaub, M. (2010). *Análisis de orina y de los líquidos corporales* (5ta ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Taxak, V. B., Khatkar, S. P., Han, S.-D., Kumar, R., y Kumar, M. (2009). Tartaric acid-assisted sol-gel synthesis of Y₂O₃:Eu³⁺ nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*, 469(1-2), 224–228. doi:10.1016/j.jallcom.2008.01.088
- Teijón, J. M., y Garrido, A. (2006). *Fundamentos de bioquímica metabólica* (2da ed.). Madrid: Tébar.
- Thian, E., Huang, J., y Vickers, M. (2006). Silicon-substituted hydroxyapatite (SiHA): A novel calcium phosphate coating for biomedical applications. *Journal of materials ...*, 1, 709–717. doi:10.1007/s10853-006-6489-8
- Torchilin, V. P. (2006). *Nanoparticulates as drug carriers* (p. xxix, 724 p.). London: Imperial College Press. Retrieved from <http://site.ebrary.com/lib/mitlibraries/docDetail.action?docID=10201228>
- Tortora, G. J., Funke, B. R., y Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología* (9na ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Uddin, M. H., Matsumoto, T., Okazaki Masayuki, Nakahira Atsushi, y Taiji, S. (2010). *Biomimetics Learning from Nature*. (A. Mukherjee, Ed.) (p. 534). InTech. doi:10.5772/198
- Valenzuela, cristóbal. (1994). *Química general. Introducción a la Química Teórica*. Salamanca: Universidad de Salamanca.
- Vásquez, G., y Echeverría, O. (2000). *Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas*. México D.F.: Universidad Autónoma de México.

- Vo-Dinh, T. (2007). *Nanotechnology in biology and medicine : methods, devices, and applications* (Taylor y F.). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Voet, D., Voet, J. G., y Pratt, C. W. (2007). *Fundamentos de Bioquímica: La vida a nivel molecular*. Madrid: Médica Panamericana.
- Wei Wang, Donglu Shi, Jie Lian, Yan Guo, Guokui Liu, Wang, L., Ewing, et al. (2006). Luminescent hydroxylapatite nanoparticles by surface functionalization. *Applied Physics Letters*, 89(18), 183106.
- Weininger, S. J., y Stermitz, F. R. (1988). *Química orgánica*. Barcelona: Reverté.
- Wells, A. F. (1978). *Química inorgánica estructural*. Barcelona: Reverté.
- Witherly, J. (2012). Glosario Hablado de Términos Genéticos. *Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano*. Retrieved from <http://www.genome.gov/glossarys>
- Yang, H., Zhuang, Y., Sun, Y., Dai, A., Shi, X., Wu, D., Li, F., et al. (2011). Targeted dual-contrast T1- and T2-weighted magnetic resonance imaging of tumors using multifunctional gadolinium-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 32(20), 4584–4593. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.018
- Yang, P., Quan, Z., Li, C., Kang, X., Lian, H., y Lin, J. (2008). Bioactive, luminescent and mesoporous europium-doped hydroxyapatite as a drug carrier. *Biomaterials*, 29(32), 4341–7. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.07.042
- Yang, P., Yang, P., Teng, X., Lin, J., y Huang, L. (2011). A novel luminescent mesoporous silica/apatite composite for controlled drug release. *Journal of Materials Chemistry*, 21(14), 5505. doi:10.1039/c0jm03878d
- Zhang, A., Zhang, J., Pan, Q., Wang, S., Jia, H., y Xu, B. (2012). Synthesis, photoluminescence and intramolecular energy transfer model of a dysprosium complex. *Journal of Luminescence*, 132(4), 965–971. doi:10.1016/j.jlumin.2011.11.023
- Zhang, C., Yang, J., Quan, Z., Yang, P., Li, C., Hou, Z., y Lin, J. (2009). Hydroxyapatite Nano- and Microcrystals with Multiform Morphologies: Controllable Synthesis and Luminescence Properties. *Crystal Growth y Design*, 9(6), 2725–2733. doi:10.1021/cg801353n
- Zhang, X.-Q., Xu, X., Bertrand, N., Pridgen, E., Swami, A., y Farokhzad, O. C. (2012). Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(13), 1363–1384. doi:10.1016/j.addr.2012.08.005

