



Universidad Autónoma de Baja California  
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO  
Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

**SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA A PARTIR DE ERIZO DE MAR  
DOPADA CON NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO COBRE (HAP:NP<sub>s</sub>  
CuO) PARA SU POSIBLE USO COMO BIOMATERIAL**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN INGENIERÍA**

PRESENTA

**Luis Eduardo Acosta Cardona**

DIRECTOR

Dr. Priscy Alfredo Luque Morales

Ensenada, Baja California, México, Agosto 2021

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

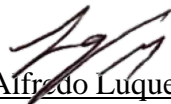
## SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA OBTENIDA A PARTIR DE ERIZO DE MAR DOPADA CON NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE (HAP: NPs CuO) PARA SU POSIBLE USO COMO BIOMATERIAL

### TESIS

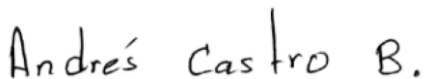
Que para obtener el grado de maestría en ingeniería presenta:

**LUIS EDUARDO ACOSTA CARDONA**

Aprobada por:



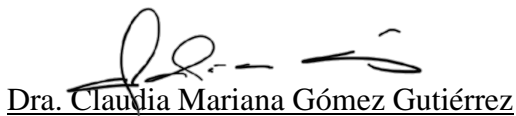
Dr. Priscy Alfredo Luque Morales  
Director de tesis



Dr. Andrés Castro Beltrán  
Codirector



Dr. Rubén César Villarreal Sánchez  
Miembro del comité



Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez  
Miembro del comité



Dr. Dante Alberto Magdaleno Moncayo  
Miembro del comité

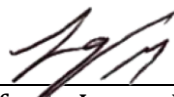
Ensenada Baja California, México. Agosto 2021

## RESUMEN

De la tesis de **Luis Eduardo Acosta Cardona**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado **MAESTRO EN INGENIERÍA**.

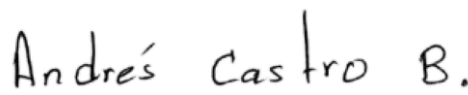
### **SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA OBTENIDA A PARTIR DE ERIZO DE MAR DOPADA CON NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE (HAP: NPs CuO) PARA SU POSIBLE USO COMO BIOMATERIAL**

Resumen aprobado por:



Dr. Priscy Alfredo Luque Morales

Director



Dr. Andrés Castro Beltrán

Codirector

En este trabajo se llevó a cabo la biosíntesis de hidroxiapatita dopada con nanopartículas de cobre por métodos de química verde, debido a que las NPs metálicas y los biomateriales como la hidroxiapatita son utilizados para la obtención de implantes, fármacos o dispositivos médicos debido a su alta biocompatibilidad y en el caso de las NPs por su alta actividad bactericida; la finalidad de este proyecto es realizar un método de síntesis de hidroxiapatita dopada con nanopartículas de óxido de cobre (Hap: NPs CuO) a partir de recursos marinos de la región, como las espinas de erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*, ya que la (Hap) es una cerámica de gran interés en el área biomédica por sus características físicas y químicas similares al hueso humano; sin embargo, presenta un alto costo comercial e infecciones posterior a la implantación, por ello surge la necesidad de encontrar un método económico y amigable con el ambiente, que promueva una actividad bactericida al material, por lo que las espinas de erizo de mar en la síntesis de Hap y NPs CuO son una excelente alternativa para ello, ya que estas espinas y las NPs CuO presentan una formación cálcica y actividad bactericida respectivamente. Las espinas fueron utilizadas para obtener carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) precursor en la síntesis de hidroxiapatita, para ello se realizaron tratamientos térmicos a  $800^\circ\text{C}$ ; posteriormente para la síntesis de Hap se agregó estequiométricamente  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , el producto obtenido se sometió a un tratamiento térmico a  $600^\circ\text{C}$ , este material se caracterizó por Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR), Difracción de Rayos X (XRD), Microscopía Electrónica de Barrido-Espectroscopia de Energía Dispersiva (SEM-EDS); con el propósito de observar los grupos funcionales ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  y Cu-O) este último correspondientes a la presencia de NPs CuO, planos cristalinos, estructura morfológica y composición elemental, y el plasmón superficial correspondiente a las NPs CuO con morfología esférica en una longitud de onda de 350nm y tamaños entre 10 y 20 nm, respectivamente.

**Palabras claves:** *Hidroxiapatita, Nanopartículas, Dopado, Bactericida, Biocompatible, Química verde.*

## **DEDICATORIA**

*Este trabajo va dedicado con mucho cariño a mis padres, Daniel Acosta y Yolanda A. Cardona, quienes siempre me apoyaron incondicionalmente y a quienes debo el apoyo que me han dado, así también, por creer en mí y darme lo necesario para construir mi futuro.*

*A Isela Vidriales quien durante todo este tiempo me dio todo su apoyo y consejos durante mi trabajo de tesis, estando en los momentos de felicidad y tristeza impulsándome siempre a seguir adelante siempre con una sonrisa.*

*A mis amigos, ya que siempre me apoyaron, aportaron ideas y me dieron ese empujón que ocupaba cuando no veía avance en mi trabajo, en especial a Zayra Ortiz quien aún a distancia ha estado apoyándome constantemente.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de maestría dentro del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (MyDCI).

A la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño (FIAD) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), por permitirme desarrollar este proyecto de tesis haciendo uso de sus instalaciones.

A mi director de tesis Dr. Priscy Alfredo Luque Morales, quien me ha guiado en la realización de este trabajo, que me ha motivado cada día para continuar con este proyecto y brindarme la oportunidad de realizar este trabajo dentro de su grupo de trabajo.

A mi codirector de tesis el Dr. Andrés Castro Beltrán, por todo el apoyo y consejos brindados durante la elaboración de mi trabajo de tesis.

Al Dr. Rubén Villarreal, Dr. Dante Magdaleno Moncayo y a la Dra. Claudia M. Gómez, mi mayor agradecimiento por sus aportaciones a este trabajo, consejos y comentarios.

Agradezco profundamente a mi familia, amigos y compañeros de clase, quienes gracias sus aportaciones, apoyos y consejos me impulsaron a continuar.

- **RESUMEN.....i**
- **DEDICATORIA.....ii**
- **AGRADECIMIENTOS.....iii**
- **CONTENIDO.....iv**
- **LISTA DE FIGURAS.....vii**
- **LISTA DE TABLAS.....ix**

## CONTENIDO

### CAPÍTULO I

1. Introducción.....	1
1.1. Nanotecnología.....	1
1.2. Biomateriales.....	2
1.3. Hidroxiapatita.....	3
1.4. Métodos de síntesis de hidroxiapatita.....	4
1.4.1. Precipitación.....	4
1.4.2. Estado sólido.....	5
1.4.3. Mecano-químico.....	6
1.4.4. Sol-gel.....	6
1.4.5. Pirolisis.....	7
1.4.6. Combustión.....	8
1.4.7. Fuentes naturales.....	8
1.5. Erizo de mar.....	10
1.6. Nanopartículas de óxido de cobre.....	10
1.7. Formación de nanopartículas.....	11
1.8. Métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de cobre.....	15
1.8.1. Química verde.....	16
1.9. Actividad antimicrobiana.....	18

### CAPITULO II

2. Estado del arte y de la técnica.....	21
2.1. Planteamiento del problema.....	23

2.2.	Justificación.....	24
2.3.	Objetivos.....	25
2.3.1.	Objetivo general.....	25
2.3.2.	Objetivos específicos.....	25

### **CAPITULO III**

3.	Fundamentos de las técnicas de caracterización.....	27
3.1.	Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).....	27
3.2.	Microscopia Electrónica de Barrido-Espectrometría de Dispersión de Energía de rayos X (SEM-EDS).....	28
3.3.	Espectrometría Fotoelectrónica de rayos X (XPS).....	30
3.4.	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	30
3.5.	Espectroscopia de UV visible (UV-Vis).....	31
3.6.	Difracción de Rayos X (DRX).....	33

### **CAPITULO IV**

4.	Sección experimental.....	37
4.1.	Materiales.....	37
4.2.	Métodos.....	37
4.2.1.	Extracto de alga.....	37
4.2.2.	Síntesis verde de las nanopartículas de óxido de cobre.....	38
4.2.3.	Síntesis y dopado de hidroxiapatita con nanopartículas de óxido de cobre.....	38
4.2.4.	Caracterización.....	42
4.2.5.	Ensayos de actividad antimicrobiana.....	43

### **CAPITULO V**

5.	Discusión de resultados.....	46
5.1.	Nanopartículas de óxido de cobre.....	46
5.1.1.	Espectroscopia de ultravioleta visible.....	46
5.1.2.	Microscopia Electrónica de Transmisión.....	47
5.1.3.	Propuesta de mecanismo de reacción de NPsCuO.....	48

5.2. Hidroxiapatita dopada con nanopartículas de óxido de cobre.....	49
5.2.1. Difracción de Rayos X.....	49
5.2.2. Microscopia Electrónica de Barrido-Espectrometría de Dispersión de Energía de rayos X (SEM-EDS).....	50
5.2.3. Microscopia Electrónica de Transmisión.....	52
5.2.4. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	54
5.3. Actividad antimicrobiana.....	55

## **CAPITULO VI**

6. Conclusión.....	57
--------------------	----

## **CAPITULO VII**

7. Referencias.....	60
---------------------	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aplicaciones de la nanotecnología.....	1
<b>Figura 2.</b> Síntesis de HAp por precipitación química.....	5
<b>Figura 3.</b> Síntesis de HAp por métodos en estado sólido.....	5
<b>Figura 4.</b> Síntesis de HAp por mecano química.....	6
<b>Figura 5.</b> Síntesis de HAp por SOL-GEL.....	7
<b>Figura 6.</b> Síntesis de HAp por pirolisis.....	7
<b>Figura 7.</b> Síntesis de HAp por método de combustión.....	8
<b>Figura 8.</b> Formas de obtención de hidroxiapatita.....	9
<b>Figura 9.</b> Diagrama de formación de nanopartículas.....	13
<b>Figura 10.</b> Resonancia de plasmón superficial de acuerdo con su morfología.....	15
<b>Figura 11.</b> Síntesis de nanopartículas por química verde.....	16
<b>Figura 12.</b> Proceso de interacción bacteriana con las nanopartículas metálicas.....	19
<b>Figura 13.</b> Incidencia de zonas afectadas por infecciones de implantes.....	24
<b>Figura 14.</b> Ejemplificación de un equipo de TEM.....	27
<b>Figura 15.</b> Componentes físicos del equipo de TEM.....	28
<b>Figura 16.</b> Partes y funcionamiento de SEM-EDS.....	29
<b>Figura 17.</b> Equipo de SEM-EDS con representación de análisis elemental.....	29
<b>Figura 18.</b> Descripción del funcionamiento del XPS.....	30
<b>Figura 19.</b> Equipo de FTIR.....	31
<b>Figura 20.</b> Diagrama del funcionamiento general del FTIR.....	31
<b>Figura 21.</b> Equipo de espectroscopia de UV-Visible.....	31
<b>Figura 22.</b> Diagrama de funcionamiento de equipo UV-Vis.....	32
<b>Figura 23.</b> Difracción de rayos X con respecto a la ley de Bragg.....	34
<b>Figura 24.</b> Ejemplificación del equipo de DRX.....	35
<b>Figura 25.</b> Proceso de síntesis de las nanopartículas de óxido de cobre.....	38
<b>Figura 26.</b> Limpieza del erizo de mar.....	39
<b>Figura 27.</b> Lavado de las espinas del erizo de mar en agua destilada.....	39
<b>Figura 28.</b> Obtención del carbonato de calcio.....	40
<b>Figura 29.</b> Adición de iones fosforo y sustitución de iones de calcio por medio de NPsCuO...	40

<b>Figura 30.</b> Proceso de filtraje del material obtenido.....	41
<b>Figura 31.</b> Material obtenido después del proceso de secado.....	41
<b>Figura 32.</b> Ensayos de inhibición antimicrobiana.....	44
<b>Figura 33.</b> Factor de resonancia de plasmón superficial para NPsCuO en UV Vis.....	46
<b>Figura 34.</b> Micrografías y análisis de tamaños de nanopartículas por medio de TEM.....	47
<b>Figura 35.</b> Diagrama del mecanismo de reacción de la síntesis de nanopartículas de óxido de cobre.....	48
<b>Figura 36.</b> Patrones de difracción de la hidroxiapatita sin y con diferentes concentraciones de Nps CuO.....	49
<b>Figura 37.</b> Morfología y análisis químico cualitativo y cuantitativo de las diferentes muestras..	51
<b>Figura 38.</b> Micrografías por TEM, alta resolución y distribución de tamaño de partículas de las muestras.....	53
<b>Figura 39.</b> Espectros de FTIR para todas las muestras sintetizadas en este trabajo.....	54
<b>Figura 40.</b> Actividad bactericida por difusión de disco.....	55

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Aplicación de la nanotecnología en diferentes sectores.....	2
<b>Tabla 2.</b> Características de los biomateriales.....	3
<b>Tabla 3.</b> Métodos de síntesis de NPs.....	15
<b>Tabla 4.</b> Resultados de ensayos de actividad bactericida.....	55

---

*CAPÍTULO I*

*INTRODUCCIÓN*

---

# CAPÍTULO I

## 1. Introducción

### 1.1. Nanotecnología

La nanotecnología es un área de investigación importante y extensa que permite manipular la materia a escala nanométrica (1-100nm) y demostrar fenómenos y propiedades totalmente nuevas, de esta manera ha utilizado para crear nuevos dispositivos, materiales y sistemas novedosos que contribuyen con la sociedad actual.

La nanotecnología es una rama de la química que comprende el estudio, diseño, síntesis, caracterización, control, manipulación y aplicación de materiales a escala nanométrica, con la finalidad de que le permita ser utilizada en aplicaciones de actividad bactericida, fotocatalisis, entre otras; por lo que presenta un gran interés en diversos campos de investigación y la industria en las áreas de electrónica, medio ambiente, medicina, entre otros [1] como se observa en la Figura 1.



**Figura 1.** Aplicaciones de la nanotecnología [2]

Los materiales nanométricos presentan características muy peculiares, como sus tamaños nanométricos; los cuales son utilizados en la agricultura, electrónica, medicina, nutrición [2], entre otras áreas debido a la posibilidad de sintetizar estos materiales en diferentes tamaños y morfologías que los hacen tener características aptas para funciones específicas como se muestra en la Tabla 1, donde se observan las diferentes aplicaciones de nanomateriales en sectores de la vida cotidiana, destacando el uso de estos como suministro de fármacos y agentes bactericidas.

**Tabla 1.** Aplicación de la nanotecnología en diferentes sectores [1-4].

Nanomaterial	Aplicación	Sector
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nanotubos de carbono</li> <li>○ Nanofiltros</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Suministro de fármacos sintéticos</li> <li>- Liberación de hormonas</li> <li>- Procesamiento de lácteos</li> <li>- Agentes antimicrobianos</li> </ul>	<b>Zootecnista</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nanorecubrimientos</li> <li>○ Nanofertilizantes</li> <li>○ Nanosensores</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protección a maquinaria</li> <li>- Control de maleza e insectos</li> <li>- Identificación de contaminantes</li> </ul>	<b>Agricultura</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nanoarcillas</li> <li>○ Nanosensores</li> <li>○ Nanopartículas</li> <li>○ Nanocapsulas</li> <li>○ Nanofiltración</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protección de alimentos envasados</li> <li>- Agentes antimicrobianos</li> <li>- Liberación de conservantes</li> <li>- Encapsulado de saborizantes, colorantes, conservantes</li> <li>- Reducción de oxidación, degradación y deformación</li> </ul>	<b>Nutrición</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nanotubos de carbono</li> <li>○ Óxidos metálicos a nanoescala</li> <li>○ Nanopartículas metálicas</li> <li>○ Dopado de nanopartículas de silica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dosificación de fármacos</li> <li>- Fotocatálisis, absorción y procesos de membrana</li> <li>- Censo y monitoreo</li> <li>- Desinfección y control microbiano</li> </ul>	<b>Farmacéutica y Medicina</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nanorecubrimientos</li> <li>○ Materiales a nanoescala</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Resistencia al desgaste y corrosión</li> <li>- Cables eléctricos</li> <li>- Baterías y supercondensadores</li> </ul>	<b>Conservación de energía</b>

En las aplicaciones anteriormente mencionadas destaca el uso de nanopartículas de titanio, zinc, oro y plata; sin embargo, los cuales debido a sus características y aplicaciones son considerados como biomateriales.

## 1.2. Biomateriales

Los biomateriales se definen como una sustancia o combinación de ellas, las cuales pueden ser de origen natural o sintético, y pueden ser utilizados por un periodo de tiempo determinado, reemplazando todo un sistema, tejido, órgano o función corporal [5], sin embargo, no cualquier material puede ser empleado como biomaterial, para poder ser utilizado este material debe ser biocompatible.

La biocompatibilidad se define como la capacidad que posee un material para ser aceptado por el cuerpo humano y que, además, no dañe tejidos aledaños, no desemboque respuesta inflamatoria, y que no genere reacciones alérgicas o carcinogénicas [6] como se muestra en la Tabla 2; existen diversos tipos de materiales que pueden ser metálicos, poliméricos y cerámicos; estos últimos actualmente son los más utilizados en el área médica debido a sus propiedades físicas y químicas

que le permiten ser biocompatibles y algunas ocasiones bioactivos, entre los materiales cerámicos bioactivos existentes esta la hidroxiapatita.

**Tabla 2.** Características de los biomateriales [7]

Características	Observaciones
<b>Biocompatible</b>	Biológicamente compatible, no causará inflamación o respuesta inmune del tejido.
<b>No inmunogénico</b>	No causará respuesta inmunogénica a los tejidos.
<b>No corrosive</b>	No debe presentar corrosión a condiciones fisiológicas.
<b>Elevada área superficial</b>	Para organizar células de alta densidad.
<b>Resistencia mecánica</b>	Resistir los estímulos <i>in vivo</i> .
<b>Esterilizable</b>	Para evitar contaminación tóxica.

### 1.3. Hidroxiapatita

La hidroxiapatita es una cerámica de carácter inorgánico con una composición de calcio y iones fosfato principalmente, misma de la cual se compone el hueso. El hueso está compuesto por una fase orgánica (20-25%), una inorgánica (60-70%) y agua (5 y 7%), la matriz orgánica está compuesta principalmente por colágeno mientras que la fase inorgánica por hidroxiapatita (Hap) cuya fórmula química es  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  como se mencionó anteriormente. En general, estos porcentajes se establecen como la composición ósea promedio, ya que esta varía según la función que tenga, edad, alimentación e incluso enfermedades [8,9].

La Hap presente en los huesos, tiene una estructura que le permite tener diferentes acomodados espaciales, por lo que la Hap biológica puede ser deficiente en calcio ( $\text{Ca}^+$ ), sodio ( $\text{Na}^+$ ), magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), fosfato ( $\text{PO}_4$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), carbonatas ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), fluoruro (F) y cloruro (Cl) que son los elementos minoritarios asociados a la Hap biológica. Estos elementos pueden estar enlazados en algún punto de la red cristalina presente en la Hap. Estos minerales, cumplen funciones específicas, que ayudan a mejorar, mantener densidad ósea y promover la mineralización ósea y la estructura de colágeno [10].

Existen diversas formas y fases de hidroxiapatita como son la Hap estequiométrica y la Hap natural, entre estas dos se presentan algunas diferencias importantes como son la relación Ca/P presente en cada una de ellas, la primera presenta una relación de 1.67, mientras que la natural presenta una relación promedio de 1.55 debido a la presencia de otros elementos presentes en la red cristalina, esta relación le hace tener una mayor capacidad de enlace al tejido óseo y en consecuencia promover la regeneración del tejido. Entre las propiedades más importantes de la Hap esta su solubilidad ya que esta varía en dependencia del medio en la que está presente, ya que solo es soluble en soluciones ácidas, poco soluble en agua desionizada e insoluble en soluciones alcalinas, estas propiedades le permiten aumentar su estabilidad en medios fisiológicos y por lo tanto aumentar el grado de biocompatibilidad, por ello es que surge la importancia de este material para ser utilizado en diversas aplicaciones ortopédicas y odontológicas como sustitutos óseos o dentales; sin embargo, aun con estas características, la Hap puede generar algún tipo de infección causada por el método de implantación utilizado y el cuidado después de realizar este proceso [11].

Respecto a la Hap existen diferentes métodos para su obtención, los cuales suelen ser por métodos físicos, químicos y biológicos (fuentes naturales), de los cuales se hablará a continuación.

#### **1.4. Métodos de síntesis de hidroxiapatita**

En cuanto a los métodos para su obtención, la Hap puede obtenerse de forma sintética o a partir de fuentes naturales, la Hap sintética se realiza con el uso de diferentes tipos de reactivos y técnicas para obtener este material. El método de síntesis de hidroxiapatita (Hap) para aplicaciones ortopédicas y odontológicas debe ofrecer un material de alto grado de pureza, rendimiento, facilidad de síntesis a bajo costo; así como también contar con propiedades como son bioactividad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, osteoconductividad y unión directa al hueso [11]. Para ello existen diversos métodos de obtención de hidroxiapatita los cuales se abordarán a continuación.

##### **1.4.1. Precipitación**

En los métodos de síntesis de hidroxiapatita, existe el proceso de precipitación química, la cual es la ruta química más sencilla para la obtención de Hap nanométrica. Este método se realiza a temperatura ambiente y pH 7.2, debido a que en estas condiciones es menos soluble y por lo general la fase de calcio-fosforo (Ca/P) es más estable en una solución acuosa, posteriormente se lleva a una temperatura cercana al punto de ebullición del agua, con el propósito de obtener

cristales de Hap, la precipitación se logra con distintos reactivos precursores de calcio y fosfato, por ejemplo, hidróxido de calcio, carbonato de calcio como fuente de iones de  $\text{Ca}^{2+}$ ; ácido fosfórico e fosfato diamonio como fuente de  $\text{PO}_4^{3-}$ , este procedimiento se logra mediante la adición gota a gota de un reactivo a otro manteniendo la relación estequiométrica (Ca/P), como último paso, la suspensión resultante es lavada y filtrada, para posteriormente secarse y llevarse a tratamiento térmico como se observa en la Figura 2, en la cual se obtiene la cristalinidad y porosidad del material [12].

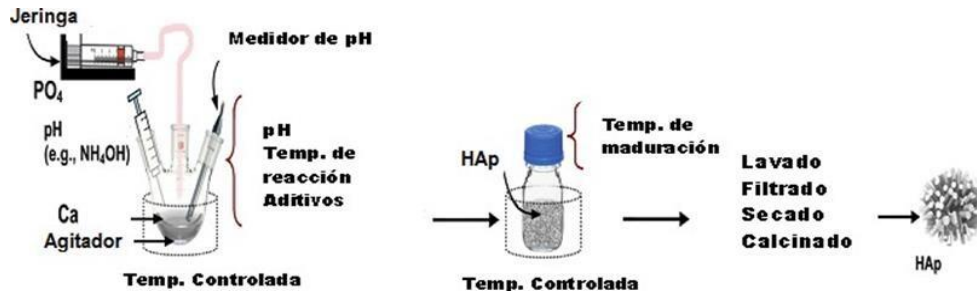


Figura 2. Síntesis de HAp por precipitación química [12].

### 1.4.2. Estado sólido

El método de síntesis en estado sólido es un proceso que es empleado para la obtención de polvos en masa, los precursores primero deben ser molidos y posteriormente calcinados en altas temperaturas, como se muestra en la Figura 3, los reactivos precursores suelen ser una sal de calcio-fósforo (Ca/P), los cuales son llevados a un proceso de calcinación (tratamiento térmico). La temperatura de calcinación conduce a la formación de la estructura cristalina del material sintetizado en este caso Hap, una desventaja de esta técnica es que un polvo obtenido por una reacción en estado sólido presenta heterogeneidad en su composición de fase, debido a los pequeños coeficientes de difusión de iones [13].

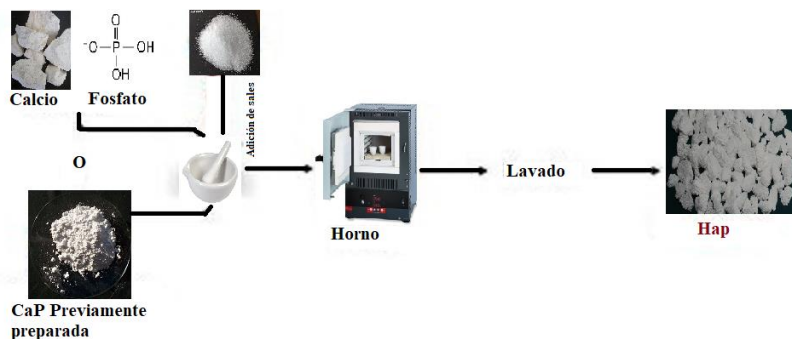


Figura 3. Síntesis de HAp por métodos en estado sólido [13]

### 1.4.3. Mecano químico

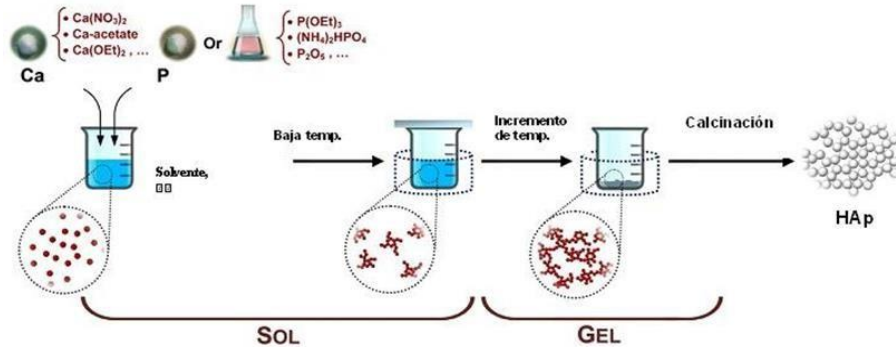
El proceso de síntesis mecano química o aleación mecánica, es un método de obtención de diversos materiales en un estado seco, entre estos materiales se encuentran aleaciones cristalinas y cerámicas, en estos métodos se obtienen materiales con estructuras bien definidas debido a la perturbación ocasionada en las superficies de las especies químicas, obteniendo ventajas como facilidad y reproducibilidad en la síntesis, para esto los reactivos precursores son molidos en un molino planetario manteniendo la relación molar entre los reactivos [14], como se muestra en la Figura 4.



Figura 4. Síntesis de HAp por mecano química [14]

### 1.4.4. Sol-Gel

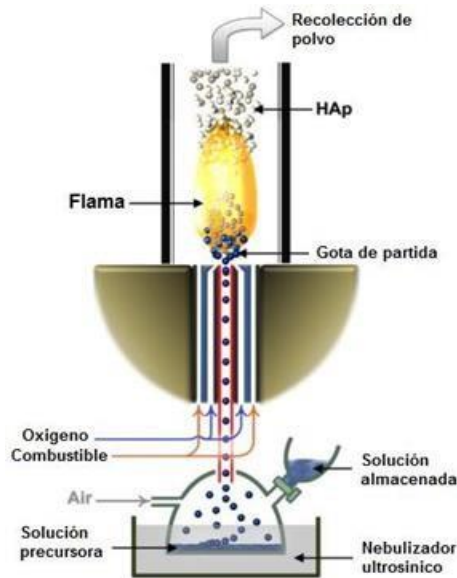
El método de síntesis por Sol-Gel involucra la evolución de redes inorgánicas a través de una suspensión coloidal (sol) y gelación de esta suspensión para formar una red en una fase líquida continua (gel), los precursores químicos para sintetizar estos coloides provienen de un elemento metálico o metaloide rodeado de varios ligandos reactivos, entre los más conocidos se encuentran los alcoxisilanos, como tetrametilortosilano (TMOS) o tetraetilortosilicato (TEOS); en el proceso de síntesis los grupos funcionales se utilizan en tres reacciones para el proceso de sol-gel las cuales son: hidrólisis, condensación de alcohol, y condensación de agua, sin embargo, las características y propiedades de una red inorgánica de sol-gel están relacionadas a factores que afectan la tasa de reacción del proceso, tales como, pH, temperatura, tiempo de reacción, concentración de reactantes, naturaleza y concentración del catalizador [15], como se muestra en la Figura 5.



**Figura 5.** Síntesis de HAp por SOL-GEL [15]

### 1.4.5. Pirolisis

El método de síntesis de pirolisis, también conocido como spray pirolisis, implica una pulverización de los reactivos precursores en una llama de un horno eléctrico utilizando un generador de ultrasonidos, seguido por una reacción de los vapores y gases generados a altas temperaturas para producir un polvo final formando aglomerados como se muestra en la Figura 6, al elevar la temperatura permite la evaporación completa del precursor además de la nucleación y crecimiento de las partículas [16].



**Figura 6.** Síntesis de HAp por pirolisis [16]

### 1.4.6. Combustión

Es un procesos para sintetizar diversas cerámicas, como nanocristales de HAp, el punto principal de esta técnica es sus capacidad para producir polvos de alta pureza de forma rápida, además, este método utiliza materiales de bajo costo y es relativamente de fácil operación, obteniendo una gran homogeneidad del polvo sintetizado, esta síntesis implica una reacción redox exotérmica rápida en una fase acuosa, estas son soluciones de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  que son mezcladas seguido de una adición de  $\text{HNO}_3$  para disolver el precipitado blanco resultante, la reacción resultante es iniciada por el calentamiento de la mezcla en un horno a una temperatura de  $300^\circ\text{C}$ , para después llevarlo a un tratamiento térmico de  $800^\circ\text{C}$ , como se observa en la Figura 7 [17].

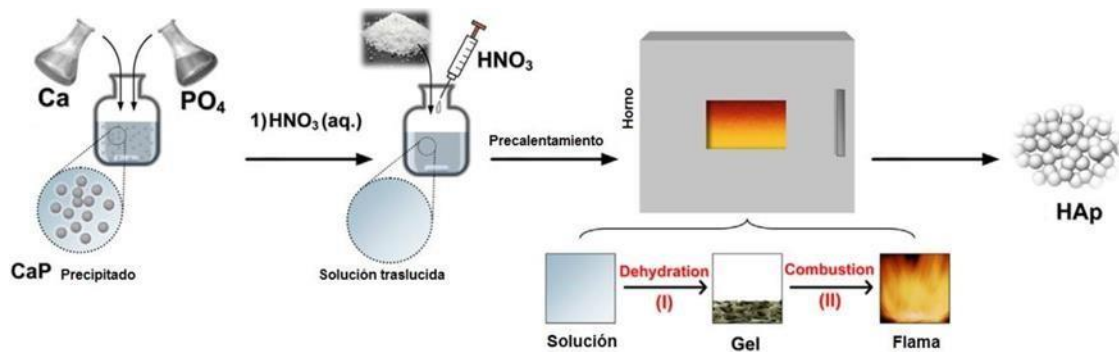
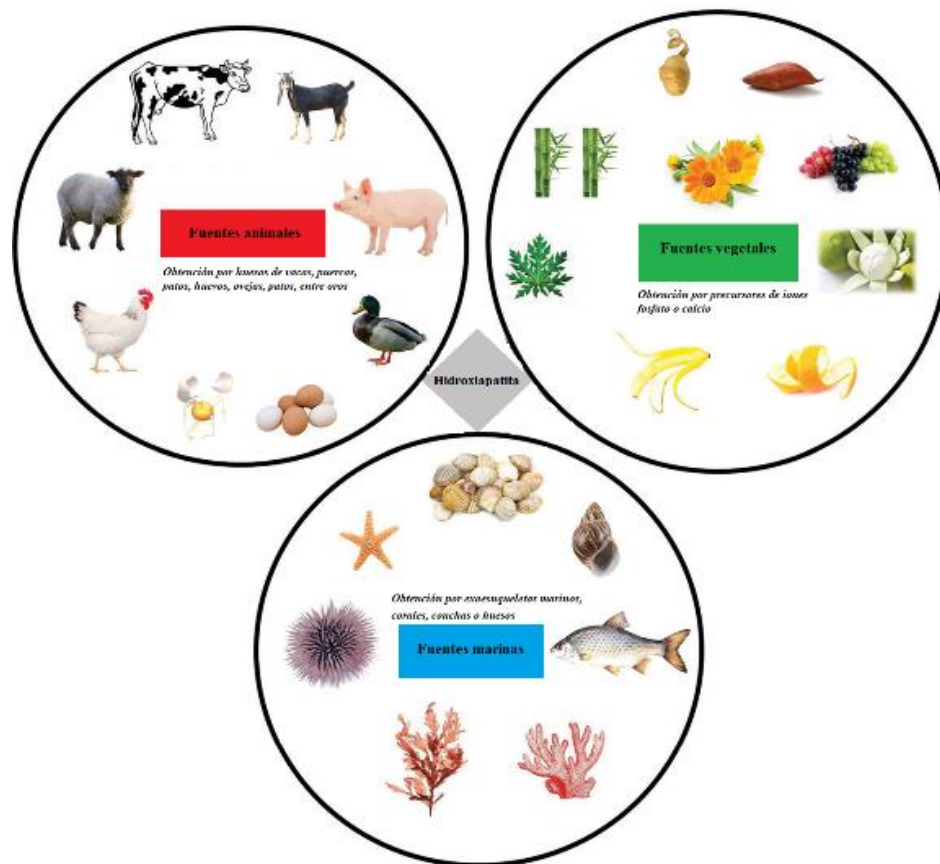


Figura 7. Síntesis de HAp por método de combustión [17]

### 1.4.7. Fuentes naturales

Las partículas de Hap generadas, parcial o totalmente a partir de fuentes biológicas, es una de las grandes opciones de síntesis de este material debido a su similitud con la apatita humana, además de presentar costos relativamente bajos, ya que suele ser extraído de residuos biológicos, estos suelen ser: hueso bovino, porcino, de pescado, corales y cascara de huevo [18], como se muestra en la Figura 8.



**Figura 8.** Formas de obtención de hidroxiapatita [18]

Para la obtención de Hap a partir de fuentes biológicas, se realizan lavados a la materia prima para la eliminación de algunas impurezas que presenten, posteriormente a ello se realiza un secado del material obtenido, y en caso de ser necesario realizar un condicionamiento de calcio o fosfato, terminando con un tratamiento al material obtenido para la formación de las fases cristalinas y eliminación de fases secundarias [18].

Como se mencionó anteriormente en estos métodos se pueden utilizar diferentes fuentes tales como corales, algas, huesos (humano, bovino, porcino, pescado, etc.), cascara de huevos, y exoesqueletos de animales marinos (erizo de mar), entre otras, sin embargo, en el caso de las espinas, la Hap está presente junto con fibras de colágeno y melanina las cuales forman la matriz del exoesqueleto. Por esta razón es necesario encontrar técnicas que permitan eliminar la fase orgánica sin degradar la fase mineral o inorgánica (Hap), para ello suelen utilizarse lavados del material en agua caliente con el fin de romper los enlaces presentes por las proteínas y de esta

manera desestabilizarlas y posteriormente realizar un tratamiento térmico con el fin de propiciar la formación de la estructura cristalina característica de la Hap [17,18].

### **1.5. Erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus***

*S. purpuratus* es el erizo de mar intermareal común en hábitat rocosos en casi todos los afloramientos a lo largo de la costa oeste desde Alaska hasta Isla de Cedros, Baja California México. El exoesqueleto está compuesto principalmente de carbonato de calcio, con presencia de Magnesio, donde el caparazón supera el contenido de magnesio en un 2.26% en comparación con las espinas, por otro lado, estudios demuestran que las espinas de *S. Purpuratus* contienen un 4% menos  $MgCO_3$  que otras especies de erizos, lo que le lleva a ser una excelente alternativa para la síntesis de hidroxiapatita [19].

Como se mencionó anteriormente la hidroxiapatita presenta propiedades físicas y químicas similares a las que presenta naturalmente el hueso humano, es por ello de su gran importancia en aplicaciones del sector médico para ser utilizado como sustitutos óseos o dentales, sin embargo, como se han mencionado al utilizar la Hap como implantes óseos suelen generar algunas complicaciones, como suelen ser algún tipo de infecciones causada por el método de implantación utilizado y el cuidado después de realizar este proceso, antes estas problemáticas se han planteado diversas alternativas como es la impregnación con algunos antibióticos, no obstante, este no ha sido aceptado debido a que las bacterias suelen generar resistencia a antibióticos, es por ello, que surgen algunas otras soluciones como son el dopado de Hap con algunos iones metálicos como la plata, oro y magnesio; así también el dopado con algunas nanopartículas de óxidos metálicos como las NPs ZnO y TiO<sub>2</sub> debido a sus propiedades antimicrobianas, en este sentido existen otras alternativas como es el uso de NPs CuO debido a su alta eficacia antimicrobiana [20].

### **1.6. Nanopartículas de óxido de cobre**

Una alternativa para la sustitución de los metales mencionados anteriormente ha sido el uso de nanopartículas de óxido cobre (NPCuO), las cuales actualmente han tomado un papel muy importante dentro del sector industrial y diversas áreas de investigación científica [21] debido a los bajos costos que presentan los precursores en comparación con los metales mencionados anteriormente, otro de los aspectos a considerar para el uso de cobre es que presenta propiedades

específicas como una alta conductividad eléctrica, alto punto de fusión y actividad antimicrobiana [22].

Las nanopartículas de óxido de cobre presentan propiedades fisicoquímicas relacionadas al tamaño, morfología; las NPs CuO como las sintetizadas en este trabajo poseen dentro de su estructura iones de cobre que les hace adquirir propiedades muy peculiares como el plasmón superficial, el cual adquiere un factor de resonancia producido por la excitación de los electrones deslocalizados al ser incididos por un haz de luz con una longitud de onda específica generando de esta manera una oscilación electrónica, esta oscilación es exclusiva de cada nanopartícula y se asocia al tamaño, forma, disposición espacial y revestimiento [23-25].

Estas características son adquiridas durante el proceso de formación de las nanopartículas, procesos que para llevarse a cabo necesita un proceso químico de oxido-reducción para la obtención de estos materiales.

### **1.7. Formación de nanopartículas**

En los procesos de formación de nanopartículas a partir de síntesis verde se llevan a cabo reacciones de oxido-reducción (REDOX) en las cuales se emplea el uso de agentes reductores y oxidantes.

Un agente oxidante es una sustancia con un estado de oxidación inicial que tiende a tomar uno o más electrones para reducirse a un estado de oxidación inferior, se describe como  $M^{a+} + ne^{-} \leftrightarrow M^{(a-n)+}$ , de manera contraria un agente reductor es una sustancia con un estado de oxidación inicial, la cual cede uno o más electrones, por lo cual tiende a oxidarse y se presenta como  $M^{a+} \leftrightarrow M^{(a+n)+} + ne^{-}$  [26].

Debido a los procesos de oxido-reducción que ocurren durante una síntesis de nanopartículas, la reacción puede ser expresada en términos de termodinámica como una celda electroquímica donde una celda electroquímica se conoce como un dispositivo capaz de obtener energía eléctrica a través de reacciones químicas. Una celda electroquímica se divide en voltaica (galvánica), en este tipo de celda ocurre una reacción espontánea (exergónica) con liberación de energía; y electrolítica, en la cual ocurre una reacción endergónica por lo que necesita adición de energía eléctrica para

llevarse a cabo, siendo un proceso poco probable o no espontáneo, la espontaneidad, indica el favorecimiento de una reacción, es decir, que tan probable es que tenga lugar el proceso [27].

Para conocer la espontaneidad de una reacción es utilizada la energía libre de Gibbs la cual indica si una reacción es favorable para valor negativo de esta y si es necesario la adición de energía para valores positivos, esta energía es posible determinarla mediante la ecuación expresada como:

$$\Delta G^\circ = -nF(\Delta E^\circ)$$

Donde  $n$  es el número de electrones,  $F$  es la constante de Faraday = 96485 C/mol.e<sup>-</sup> y  $\Delta E^\circ$  es el potencial de celda. El potencial de celda (voltaje de celda) es la diferencia de voltajes entre la reacción del agente reductor y oxidante, expresada de la siguiente manera, obteniendo un resultado negativo o positivo según sea el caso de reacción:

$$\Delta E^\circ = E^\circ(\text{agente reductor}) - E^\circ(\text{agente oxidante}).$$

Al tener como resultado un valor negativo de energía libre de Gibbs se entiende que la formación de NPCuO por reducción del ion cobre por ácido gálico como agente reductor se da espontáneamente, esto es debido a que el potencial de celda del ácido gálico es mayor que el del cobre por lo que tiene la capacidad suficiente para reducir el ion metálico sin tener la necesidad de añadir energía eléctrica.

Además de la explicación termodinámica para la formación de NPs se establecen diversas teorías como la Teoría Clásica de Nucleación (CNT), la nucleación se entiende como el cambio de estado de químico de una partícula, se aplica para un sistema termodinámico el cual busca disminuir su energía libre de Gibbs (proceso espontáneo), para explicar este fenómeno es necesario conocer los tipos de nucleación existentes.

- **Nucleación homogénea:**

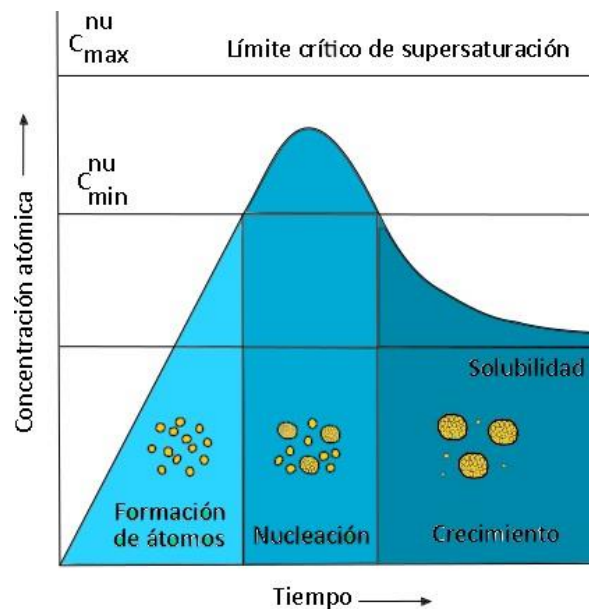
Se presenta para elementos química, energética y estructuralmente idénticos, donde la formación de núcleos se da de manera aleatoria en todas las zonas de la superficie.

- **Nucleación heterogénea:**

En esta teoría se propicia la formación de núcleos sobre sitios de cambios de fase [28].

Para la Teoría Clásica de Nucleación se estableció el postulado de LaMer el cual propone el concepto de nucleación en ráfaga, en el cual separa el proceso de nucleación y crecimiento, donde establece una nucleación homogénea con posterior crecimiento sin posibilidad de nuclear, la explicación del modelo está dividida en 3 partes:

1. Se da una disminución del precursor lo cual resulta en una generación de átomos y su aumento en la concentración hasta un nivel de sobresaturación crítica  $C_s$ , donde se da la nucleación homogénea.
2. En este punto se llega al proceso de saturación para la nucleación  $C_{min}$ , en el cual inicia el proceso de nucleación en ráfaga, hasta llegar a un punto de saturación crítica  $C_{max}$  en el cual se supera la energía de activación de las moléculas empezando a formar núcleos, lo cual en consecuencia disminuye la cantidad de moléculas libres por lo que se genera una concentración mínima de nucleación  $C_{min}$ , dando lugar a un proceso de crecimiento.
3. Después de ello ya no existe nucleación, sino un proceso de crecimiento por aglomeración molecular debido a que los monómeros o moléculas precursoras se encuentran en tamaños equitativos [29], estas etapas se ejemplifican en la Figura 9, donde se muestra un diagrama de formación de NPs.



**Figura 9.** Diagrama de formación de nanopartículas [30].

Para explicar los fenómenos de crecimiento, una de las teorías más importantes sobre maduración de nanopartículas es el postulado de Ostwald, el cual parte de los siguientes principios [31]:

- a) Las partículas suspendidas están fijas en el espacio o medio de interacción.
- b) El sistema es infinitamente diluido por lo que no existen colisiones entre partículas.
- c) La concentración de fase interna en el líquido circundante sea agua o aceite es la misma a través de todo el sistema.

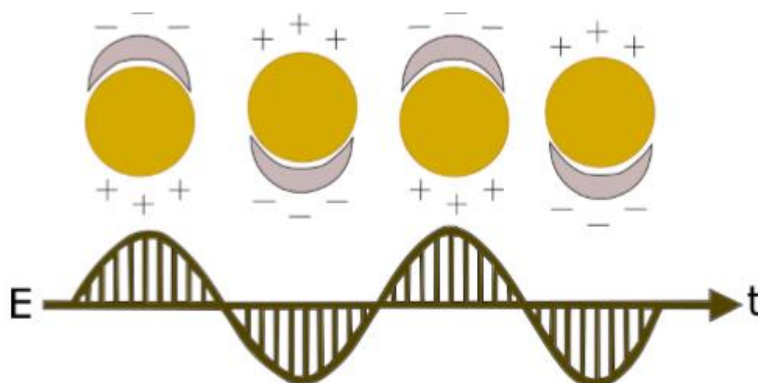
En general gracias a este postulado es posible determinar en cierta medida si el tamaño de las partículas se incrementa a través de un proceso mixto de floculación y coalescencia, debido a que la coalescencia aumenta la polidispersidad de una dispersión, se conoce como coalescencia a la posibilidad de que dos o más materiales se unan en un único cuerpo (núcleo) aumentando su tamaño original, este proceso regularmente está asociada a interacciones metálicas en un medio coloidal [32].

Otras de las teorías para explicar el fenómeno de crecimiento o maduración de partículas en una solución coloidal son los postulados de DLVO (Derjaguin, Landau, Vervev, Overbeek) y de Von Smoluchowski, los cuales en base a la teoría cinética de la materia el cual permite obtener una distribución de tamaño agregado en función del tiempo de agregación en la suspensión coloidal, determinando tamaños de partículas discretos en una distribución continua a través del medio, estos postulados se basan en los conceptos para la escala molecular como lo son fuerzas de Van der Waals, difusión y choque bimolecular, esto debido a que las fuerzas de van der Waals es una interacción dependiente de los átomos circundantes, por lo que es posible conocer los estados de integración molecular entre átomos en estados químicamente inestables, hasta llegar a una estabilidad coloidal [33,34].

Al finalizar el proceso de nucleación y crecimiento de nanopartículas las NPs adquieren diversos tamaños y morfologías que varían con respecto al tiempo de síntesis y temperaturas durante la formación de estas.

En cuanto al tamaño y morfología, de acuerdo a estudios realizados, la banda de Plasmon Superficial (SPR) de las nanopartículas (NPs) se puede observar en la región del espectro visible para partículas con tamaño mayor de 1 nm, debajo de esta dimensión la banda no es perceptible debido a la baja interacción con la materia, además de la variación en la dimensión, también la morfología afecta la posición e intensidad de la banda SPR en nanoestructuras metálicas, sin embargo, la correlación entre la morfología de las nanopartículas metálicas y su respuesta espectral resonante del plasmón no se ha investigado ya que existen dificultades para obtener partículas con

monodispersidad en cuanto a morfología; de aquí que se mencionan solo algunas formas geométricas de las cuales se tiene evidencia espectral y estudios sistemáticos entre las propiedades ópticas y dimensión [35-40], se puede observar en la Figura 10 el nivel resonante del plasmon superficial de las nanopartículas en dependencia de su morfología.



**Figura 10.** Resonancia de plasmón superficial de acuerdo con su morfología [41]

### 1.8. Métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de cobre

Los métodos de síntesis de nanopartículas pueden clasificarse en síntesis químicas, físicas y verdes, las cuales se resumen en la Tabla 3 donde se muestran los métodos de síntesis existentes y sus respectivas características y usos.

**Tabla 3.** Métodos de síntesis de NPs

Tipo de síntesis	Metodologías	Características	Tipo de nanopartículas	Referencia
Físicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Ablación laser</li> <li>○ Microondas</li> <li>○ Ultrasonido</li> <li>○ Descarga de chispa</li> <li>○ Sputtering</li> <li>○ Hidrotermal</li> </ul>	Uso de factores extrínsecos para sobre pasar el bandgap energético del compuesto metálico	Ag, Ti, Zn, y Au	[42-48]
Químicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Coprecipitación</li> <li>○ Micro emulsión</li> <li>○ Sol-gel</li> <li>○ Hidrotermal</li> <li>○ Gas inerte</li> </ul>	Uso de agentes reductores sintéticos para la reducción del ion metálico	Ag, Au, Zn, CuO, y Sn	[49-55]
Verdes	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Biológicos</li> <li>○ Extracto de plantas</li> </ul>	Uso del metabolismo celular o extracto natural de plantas para la reducción de iones metálicos	Ag, Au, Zn, Sn, y CuO	[56-57]

- **Síntesis verde**

Los métodos de biosíntesis o síntesis verde proporcionan un protocolo ambientalmente positivo, poco tóxico, rentable y eficiente para sintetizar y fabricar NP. Emplean sistemas biológicos como bacterias, hongos, virus, levaduras, actinomicetos, extractos de plantas, etc como se observa en la Figura 11 donde se muestra el proceso general de síntesis por química verde. para la síntesis de NP de metales y óxidos metálicos. Los métodos verdes se pueden dividir en tres categorías:

1. Síntesis utilizando microorganismos.
2. Síntesis utilizando biomoléculas como plantillas.
3. Síntesis utilizando extractos de plantas [58].

Las nanopartículas durante la síntesis pasan a través de varias etapas para lograr su formación, las cuales siguen de manera continua hasta lograr una estabilidad coloidal.



**Figura 11.** Síntesis de nanopartículas por química verde [58]

### 1.8.1. Química verde

Debido a las situaciones ambientales como la contaminación que se presentan en la actualidad, esto ha hecho que en los últimos años surja un nuevo enfoque dentro de la química, el cual tiene como propósito minimizar la contaminación en la generación de materiales, tanto en los

laboratorios de investigación como en el sector industrial, a lo cual se le denominó ‘Química Verde’.

La química verde va más allá del tratamiento de residuos contaminantes que pudieran generarse durante un proceso químico, sino algo mucho más importante como es evitar parcial o totalmente la formación de desechos contaminantes y propiciar un método que promueva la optimización de recursos y tiempos de reacción. De forma general la química verde se ocupa del diseño de productos y procesos químicos que eliminan el uso y producción de sustancias tóxicas [59], basándose en 12 principios que fueron planteados por Paul Anastas y John Warner en 1998 [60].

### **12 principios de la química verde**

1. Prevención: este principio se basa en prevenir la generación de desperdicios.
2. Economía del átomo: Los métodos deben diseñarse para maximizar la incorporación de todos los materiales en el método de síntesis.
3. Síntesis química menos peligrosa: los métodos deben diseñarse para usar y generar sustancias que tengan poca o nula toxicidad para la salud y medio ambiente.
4. Diseñar productos químicos más seguros: Los productos químicos deben diseñarse para afectar su función deseada mientras se minimiza su toxicidad.
5. Solventes y auxiliares más seguros: El uso de sustancias auxiliares como disolventes, agentes de separación, etc., debería hacerse innecesario siempre que sea posible.
6. Diseño para la eficiencia energética: Los requisitos energéticos de los procesos químicos deben reconocerse por sus impactos ambientales y económicos. Si es posible, los métodos sintéticos deben realizarse a temperatura y presión ambiental.
7. Uso de materias primas renovables. Una materia prima debe ser renovable en lugar de agotarse siempre que sea técnica y económicamente factible.
8. Reducir los derivados: La derivatización innecesaria como suelen ser por el uso de grupos de bloqueo, protección/desprotección, modificación temporal de procesos físicos/químicos debe evitarse, ya que estos pasos requieren reactivos adicionales.
9. Catálisis: Los reactivos catalíticos deben ser altamente selectivos debido a que son superiores a los reactivos estequiométricos.
10. Diseño para degradación: los productos químicos deben diseñarse de modo que al final de su función se descompongan en productos inocuos de degradación.

11. Análisis en tiempo real para la prevención de la contaminación: Las metodologías analíticas deben desarrollarse aún más para permitir la supervisión y el control en el proceso en tiempo real.
12. Química inherentemente más segura para la prevención de accidentes: las sustancias y la forma de una sustancia utilizada en un proceso químico se deben elegir para minimizar el potencial de accidentes químicos, incluidas las emisiones, explosiones e incendios.

La química verde es una alternativa ecológica para la síntesis de materiales, la cual consiste en el diseño de productos orgánicos y procesos para reducir o eliminar el uso o la generación de sustancias peligrosas para el medio ambiente, por ello se plantea utilizar algas marinas para la reducción del ion cobre.

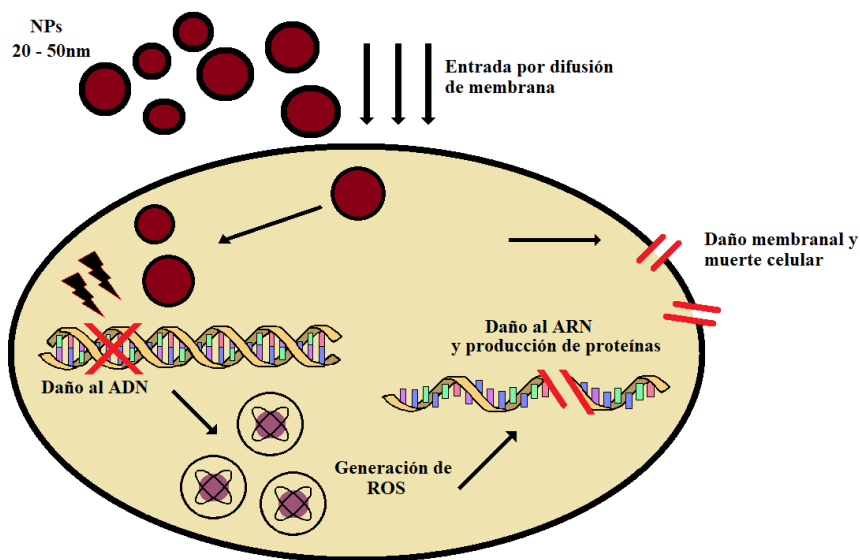
Para la síntesis de nanopartículas de óxido de cobre la química verde es un método ampliamente utilizado, por ello, surge la necesidad de buscar y emplear extractos naturales para la reducción metálica, por lo tanto el emplear extracto de alga de *Gellidium robustum* es una excelente alternativa, ya que es una macroalga presente en la zona costa del océano pacifico, con mayor presencia en la región de Ensenada B.C., esta alga tiene la capacidad de reducción y estabilización de iones metálicos como la plata y cobre, esta especie es utilizada en estas aplicaciones debido a que presenta una gran cantidad de aceites fenólicos y flavonoides dentro de su composición química, como también una serie de azúcares reductores que permiten el encapsulamiento y reducción de iones metálicos para la formación de nanopartículas, de esta manera se propicia una síntesis verde, económica y no contaminante para la producción de materiales nanoparticulados con potenciales aplicaciones biomédicas como actividad antimicrobiana [61-62].

### **1.9. Actividad antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas es una característica de gran importancia en el área biomédica debido a la existencia de diversas complicaciones causadas por algunas bacterias, las cuales son ocasionadas al implantar sustitutos óseos que a causa de un mal cuidado de la zona conlleva a una contaminación de la misma, además existe la posibilidad de presentar otras complicaciones en procesos posoperatorios, heridas en personas diabéticas y en algunos casos de endodoncias [63-65].

En la actualidad se han realizado estudios con la intención de comprobar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas que, de acuerdo con los resultados de estas investigaciones, se ha demostrado que las NPCuO presentan una mayor actividad bactericida a comparación que las NPAg

Algunas nanopartículas tienen la tendencia de generar entornos oxidativos proceso por el cual adquieren la capacidad antimicrobiana que les caracteriza, con la cual rompe la pared celular de las bacterias e inhibe la replicación del DNA y síntesis de proteínas por lo cual produce la muerte bacteriana como se observa en la Figura 12 [66].



**Figura 12.** Proceso de interacción bacteriana con las nanopartículas metálicas [67].

Como se mencionó anteriormente las nanopartículas presentan una amplia actividad antimicrobiana, así como un potencial en fotocatalisis, no obstante, para mejorar estos procesos es conveniente dopar o impregnar las nanopartículas en un biomaterial cerámico que le facilite su aplicación y difusión [68].

---

*CAPÍTULO II*

*ESTADO DEL ARTE Y*

*DE LA TÉCNICA*

---

## Capítulo II

### 2. Estado del arte y de la técnica

En el mercado existen diversas muestras de hidroxiapatita que son distribuidas comercialmente en las que se utiliza hueso de bovino o síntesis química para la obtención de Hap, en el caso de PepGenP15® utiliza hueso bovino calcinado a 1,100°C recubierto con pentadecapéptido una secuencia perteneciente al colágeno tipo 1; Endobon® y Cerabone®, son materiales de hueso de bovino y método químico respectivamente, los cuales son sintetizados a altas temperaturas superiores a 1200°C; BiOss® es un material de Hap obtenido por la combinación de un método químico y una fuente de hueso con el fin de promover los componentes inorgánicos de la Hap, es decir, su parte mineral es obtenida al remover el material orgánico por procesos de lavados en altas temperaturas y un proceso de secado en temperaturas mayores a 300°C; además, existen otros materiales para injerto de hueso, los cuales utilizan hueso bovino que son tratados químicamente con cloroformo/metanol y peróxido de hidrógeno para remover todo el componente orgánico excepto el colágeno, sin embargo, estos no son utilizados en el sector médico [69].

Además de estos productos, también existen algunas patentes relacionadas con esta investigación las cuales se citan a continuación se citan algunas patentes relacionadas con métodos de síntesis de Hap sintética o de origen natural.

La patente WO2007/132026 se refiere a un método para obtener hidroxiapatita basada en la reacción entre óxido de calcio y ácido fosfórico para la obtención de la composición de fosfato de calcio con el patrón de rayos X característico de la hidroxiapatita, donde hasta el 10% de los aniones fosfatos del cristal está sustituido con aniones de carbonato y al menos 90% de las partículas tienen un tamaño de 10 a 260 micras, por lo que presenta la desventaja de ser un método sintético que puede no ser favorable para la interacción con tejidos biológicos al ser implantados, para estas actividades son necesarias relaciones molares bajas obtenidas por métodos naturales.

La patente ES2273412T3 se refiere a la obtención de compuesto de hidroxiapatita sobre un sustrato sumergiendo el sustrato en una solución con iones de calcio y luego en una solución con iones  $PO_4$ , en la cual se obtiene hidroxiapatita con una estructura cristalina definida, pero con porosidades saturadas que no permitirían el crecimiento celular, por lo que se plantea metodologías alternas que promuevan el crecimiento celular.

La patente FR2678258 se refiere a un proceso de síntesis de hidroxiapatita o fosfato tricálcico semi-sintética a partir de apatitas naturales. La patente japonesa JP01224214 se refiere a la obtención de hidroxiapatita pura a partir de hueso mediante calcinación a altas temperaturas de 1,200°C en una atmósfera oxidativa y luego el polvo se sumerge en una solución de iones de ácido fosfórico cuya fuente es  $H_3PO_4$  y luego se lava con agua. La patente JP04198007 se refiere a la obtención de hidroxiapatita a partir de hueso de pescado hervido en agua purificada, utilizando una proteasa a 50-70°C, donde la sustancia obtenida es tratada con una solución alcalina de NaOH a 90-98°C, agitándose para descomponer los residuos orgánicos y suprimir la formación de  $Ca_3(PO_4)_2$  durante el proceso de calentamiento, el componente del hueso se separa y se lava con agua para obtener la hidroxiapatita pura, luego se quema en una atmósfera oxidante a 350-1,200°C y se limpia con una solución acuosa con pH específico y en un tiempo definido, donde luego se vuelve a quemar en atmósfera oxidante para obtener así hidroxiapatita no diluida por un compuesto alcalino.

Por último, la solicitud de patente WO/2012/052035 se refiere a un proceso para obtener hidroxiapatita de hueso bovino que comprende algunos pasos fisicoquímicos de limpieza con detergente, donde luego se alternan tratamientos hidrotermales de vapor y alta presión y medios alcalinos aplicados de manera repetitiva para eliminar el componente orgánico y después un proceso de calentamiento, sin exceder de 650°C en una atmósfera ionizante. El producto obtenido presenta un tamaño de partícula de 200 a 250 micras que cumplen parcialmente los requerimientos para aplicaciones biomédicas, ya que pueden presentarse infecciones o una disminución de su actividad biológica derivado de las metodologías utilizadas que pueden alterar la composición y forma de la Hap, ante estas problemáticas existen algunos trabajos que se han realizado y publicado.

Además, existen reportes de procedimientos para obtener la Hap de hueso de bovino aplicando diferentes tratamientos no comerciales. Kusrini y colaboradores usan el fémur del bovino, al cual se remueve el tejido visible y las sustancias que están en la superficie del hueso, luego se hace un proceso de desgrasado en agua hirviendo seguida por un secado al sol, por último, la muestra, después de ser cortada en formas rectangulares, se sintetiza en vacío con temperaturas entre los 400°C, con rampas de 5°C /min durante 2-4 h y se deja enfriar en vacío lentamente, y por último se convierte en polvo por una molienda [70].

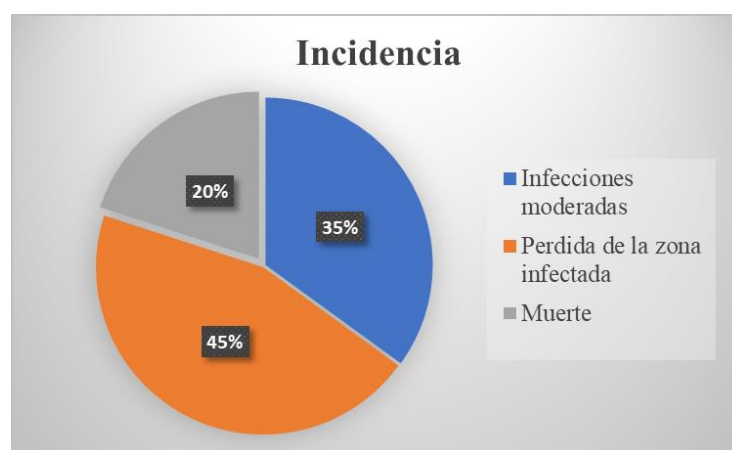
Debido a la carencia de actividad bactericida y a la alta incidencia de infección después de implantaciones de materiales de este tipo surge la necesidad de atender a esta situación, por ello Madeeha Riaz y colaboradores reportaron un método de síntesis de hidroxiapatita no natural dopada con iones plata, este material fue desarrollado por un método químico, en este caso por precipitación química, obteniendo como resultados un adecuado dopaje del material y con una buena actividad bactericida, sin embargo, presentaron algunas complicaciones como toxicidad celular y un bajo nivel de difusión derivado del dopaje con iones de plata, mismos que son tóxicos para algunos tipos de células [71], además, Teodóra Nagyné-Kovács y colaboradores propusieron una solución al problema de difusión de este material, realizó un dopado de la hidroxiapatita con iones de magnesio, que aunque presentó buenos resultados de dopaje del material, un buen nivel de difusión celular, sin embargo, presentó una nula actividad bactericida, por lo que no solucionó el problema original de este material [72].

De esta manera se puede observar, que las técnicas utilizadas para obtener Hap a partir de hueso son extremadamente variables y corresponden a métodos químicos, tales como por ejemplo tratamientos con ácidos y bases, como también a métodos térmicos como por ejemplo la calcinación y también a la combinación de métodos químicos y físicos como la precipitación en los que se busca encontrar Hap con la composición que se necesite para la aplicación necesaria. Sin embargo, en cada una de las técnicas utilizadas es necesario el control adecuado de las variables que intervienen, ya que estas pueden afectar la pureza del material que se obtenga y en consecuencia verse afectadas propiedades que debe cumplir el material para ser implantado, siendo además, que no complementan las funciones de la hidroxiapatita, ya que suelen presentarse infecciones al ser implantado, por lo que es necesario proponer alternativas que ofrezcan un método económico, natural, eficaz y efectivo para la síntesis de Hap con una alta actividad bactericida manteniendo su biocompatibilidad, bioactividad y composición elemental.

## **2.1. Planteamiento del problema**

Actualmente la hidroxiapatita es una biocerámica con un alto grado de aceptación en el área ortopédica y odontológica, esto por sus propiedades físicas, químicas y biológicas, además de su alto grado de biocompatibilidad, sin embargo, existe una gran diversidad de métodos para la obtención de hidroxiapatita como se mencionó anteriormente, no obstante estas técnicas presentan un alto costo de producción que van desde 10,000-20,000 por kilogramo, influyendo directamente

en su valor comercial, por ello en los últimos años se ha optado por la obtención de este material a partir de fuentes o residuos biológicos como son los huesos, cascarras o espinas de diferentes organismos, como son las espinas del erizo de mar, el cual es una especie de gran abundancia en la región; siendo Baja California el primer lugar de pesca de esta especie en la república mexicana aportando el 30.17% de la producción en México, lo que representa más de 100 toneladas al día en Baja California, representando Ensenada más del 75% de la producción pesquera en la región [73], por lo que la cantidad de residuos obtenidos de estos es muy alto causando un alto grado de contaminación por residuos biológicos los cuales a su vez pueden ser causas de diversas infecciones en los organismos que habitan en los ecosistemas en los cuales son liberados estos desechos, no obstante, existe la posibilidad de obtener un producto de gran interés biomédico como es la hidroxiapatita a partir de estos desechos, la cual es posible mejorar sus propiedades gracias al dopado de este material con algunas especies de nanopartículas metálicas tales como el cobre, la cual le daría mejores propiedades de difusión y actividad bactericida, de acuerdo con datos del IMSS anualmente se realizan más de 70,000 implantes donde un gran porcentaje de los implantes realizados sufren complicaciones por infecciones en la zona afectada representando un 48% de los implantes totales como se observa en la Figura 13, los cuales a su vez presentan mayores complicaciones como a amputación de la zona e incluso la muerte, de aquí la necesidad de obtener hidroxiapatita con capacidades antimicrobianas para evitar este tipo de complicaciones [74].



**Figura 13.** Incidencia de zonas afectadas por infecciones de implantes (IMSS, 2017).

## 2.2. Justificación

La hidroxiapatita es un material de gran importancia en la industria biomédica, la cual tiene una gran cantidad de aplicaciones debido a sus excelentes características, sin embargo, presentan

costos muy elevados de alrededor de los 10,000-20,000 pesos por kilogramo de material, no obstante, con la utilización de residuos biológicos como son huesos o espinas del erizo de mar misma que es una especie de gran abundancia en la región, la cual podría ser utilizada para la obtención de hidroxiapatita permitiendo disminuir los costos de producción y en consecuencia disminuir su valor comercial, además de ayudar a disminuir la contaminación provocada por los desechos biológicos de organismos marinos. La hidroxiapatita gracias a sus características y propiedades ha sido ampliamente utilizado como sustitutos óseos o dentales, sin embargo, durante la implantación, como en el transcurso de vida útil del material dentro del cuerpo se han presentado inconvenientes tales como infecciones, de ahí la importancia de dar a la hidroxiapatita propiedades antimicrobianas, lo cual se lograra mediante el dopado de este material con nanopartículas metálicas, tales como las nanopartículas de cobre, las cuales poseen propiedades antimicrobianas y con posibilidad de utilizar como agente de terapia usando las propiedades de su plasmón de superficie.

### **2.3. Objetivos**

#### **2.3.1. Objetivo general**

Sintetizar, caracterizar y dopar hidroxiapatita obtenida por erizo de mar con nanopartículas de óxido de cobre, con uso potencial en regeneración ósea

#### **2.3.2. Objetivos específicos**

- Sintetizar hidroxiapatita a partir de espinas de erizo de mar *S. purpuratus*
- Sintetizar nanopartículas de óxido de cobre por química verde a partir de *G. Robustum*
- Dopar la hidroxiapatita con nanopartículas de óxido de cobre
- Caracterizar el material por FTIR para la visualización de grupos funcionales, XRD análisis de cristalinidad del material, SEM-EDS análisis morfológico y elemental, TEM determinación del tamaño de partículas
- Evaluar actividad antimicrobiana de los materiales obtenidos

---

*CAPÍTULO III*

*FUNDAMENTO DE LAS*

*TÉCNICAS DE*

*CARACTERIZACIÓN*

---

## CAPÍTULO III

### 3. Fundamentos de las técnicas de caracterización

#### 3.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM):

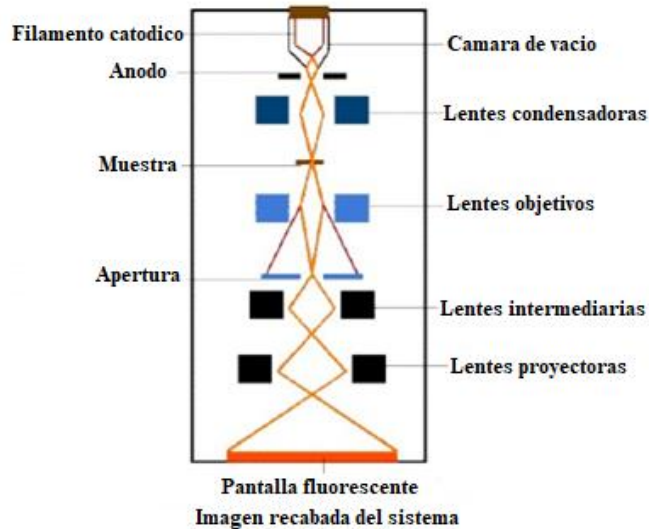
Es una técnica de microscopía en la que se transmite un haz de electrones a través de una muestra dando lugar a diversos fenómenos, en esta técnica algunos electrones pasan a través de la muestra dando lugar a la formación de una imagen, el equipo de TEM puede observarse en la Figura 14 [75].



**Figura 14.** Ejemplificación de un equipo de TEM [75]

El TEM está compuesto por una cámara, un condensador, un detector, y una serie de lentes para finalmente pasar a una pantalla fluorescente y ser procesada la imagen en un equipo de cómputo. Primeramente un filamento metálico, generalmente de Tungsteno se expone a altas temperaturas, para causar una excitación electrónica, los electrones liberados por esta acción pasan a través del condensador donde la energía de estos es igualada, después de ello los electrones siguen el camino por el sistema al vacío con el propósito de mantener el movimiento de estos los cuales harán colisión con la muestra a analizar, el choque de estos electrones da lugar a diferentes fenómenos, ya que algunos de estos electrones serán difractados y algunos otros serán transmitidos a un detector (pasarán a través de la muestra), al ocurrir este fenómeno se formará una imagen la cual será amplificada por la primera lente condensadora, posteriormente la imagen pasará a otra lente donde se disminuirá su tamaño con el propósito de eliminar la mayor cantidad de ruido posible (interferencias), finalmente la imagen obtenida pasará por otra lente donde esta será amplificada

nuevamente en mejor resolución, esta última imagen capturada pasara a la pantalla fluorescente donde será analizada y pasara al equipo donde se realizara el procesamiento de obtención de imágenes [76], lo cual puede observarse en la Figura 15 en donde se observa los componentes principales de esta técnica. Esta técnica de caracterización se utiliza para análisis estructurales, cristalinidad de materiales, morfología y tamaño de nanopartículas, así como también de interacción o adherencia celular.



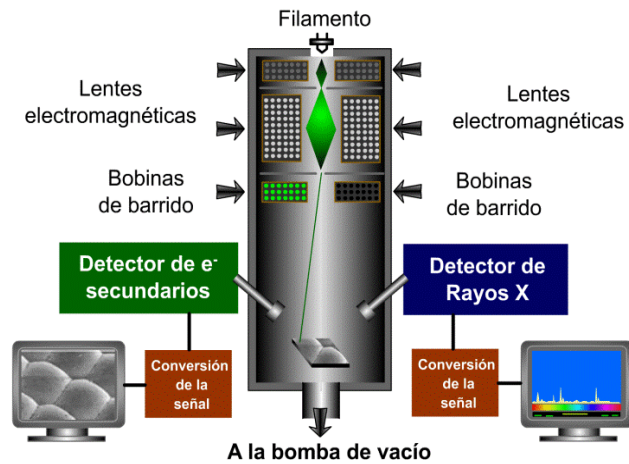
**Figura 15.** Componentes físicos del equipo de TEM [77]

### **3.2. Microscopia Electrónica de Barrido-Espectrometría de Dispersión de Energía de rayos X (SEM-EDS):**

El Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) es una técnica de caracterización que permite realizar estudios morfológicos, de la misma manera para la obtención de un análisis elemental por espectroscopia de energía dispersiva (EDS) en superficies de muestras conductoras, así como determinación de espesores de recubrimientos, identificación de contaminantes en dispositivos electrónicos, metales, cerámicos [78].

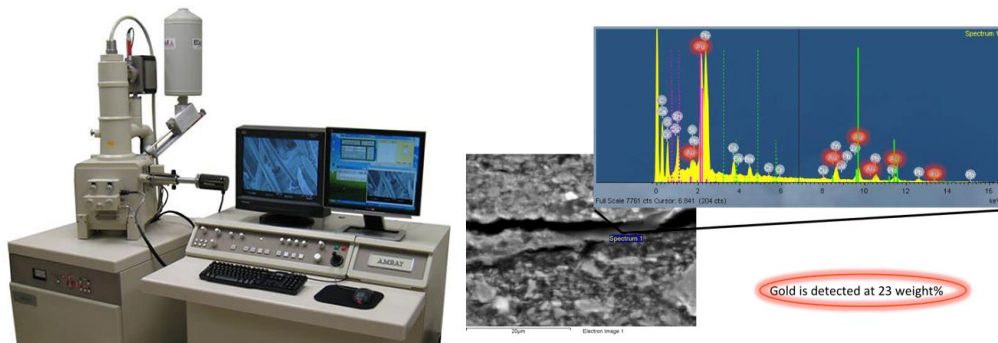
El EDS es una técnica de caracterización que permite hacer estudios de análisis elemental basado en la cantidad de energía dispersiva de la molécula de interés, proceso que puede realizarse a superficies de muestras sólidas, para la identificación de contaminantes en dispositivos electrónicos, metales, cerámicos, entre otras [79].

El SEM-EDS se basa en un haz de electrones que incide sobre una superficie, estos electrones son producidos por un cañón de electrones acelerados, que posteriormente son focalizados sobre la superficie del material a partir de una serie de lentes electromagnéticas, el cual escanea la superficie de la muestra por medio de una serie de bobinas de barrido sincronizadas con un tubo de rayos catódicos, las señales son generadas por la interacción del haz con la superficie de la muestra y que posteriormente son colectadas y amplificadas por un detector, mostrando el resultados sobre el tubo de rayos catódico [80] como se observa en la Figura 16.



**Figura 16.** Partes y funcionamiento de SEM-EDS [80]

En el EDS los electrones que colisionan sobre la muestra generan una interferencia constructiva, razón por la cual algunos electrones serán difractados con un ángulo que satisface la ley de Bragg, mismos que se encontraran energizados por el choque electrónico, fenómeno que causara una obtención de rayos X, los cuales serán detectados por el equipo que de acuerdo a la cantidad energética registrada se dará como resultado una gráfica de composición elemental, tal como se observa en la Figura 17 [81].



**Figura 17.** Equipo de SEM-EDS con representación de análisis elemental [82]

### 3.3. Espectrometría Fotoelectrónica de rayos X (XPS):

XPS también conocida como espectroscopía electrónica para análisis químico (ESCA), es una técnica para analizar la composición química de la superficie de un material. El XPS puede medir la composición elemental, fórmula empírica, estado oxidación y estado electrónico de los elementos dentro de un material [83].

En el XPS se produce una emisión de fotones de rayos X al vacío, los cuales incidirán sobre una muestra de análisis, la energía fotónica incidente hará que los electrones superficiales de la muestra sean emitidos por una energía distinta a la original, este electrón será recibido por un detector el cual analizará el cambio energético del electrón y de acuerdo con este cambio energético dará como resultado una gráfica y tabla de datos de los elementos y compuestos presentes [84], así como su estado de oxidación como se muestra en la Figura 18, donde se muestra un diagrama general del funcionamiento del XPS.

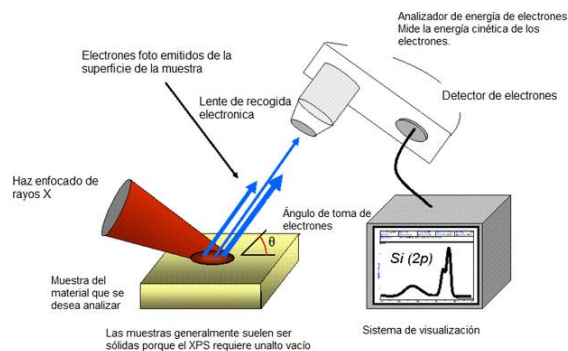
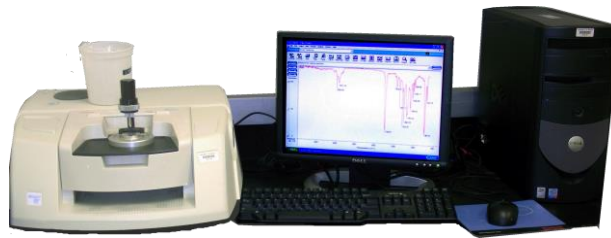


Figura 18. Descripción del funcionamiento del XPS [84].

### 3.4. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR):

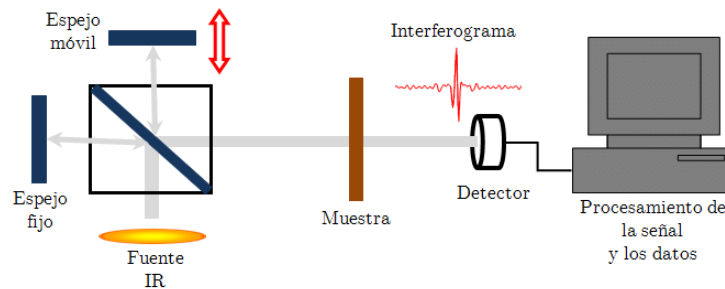
La Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) es una técnica donde se estudia la absorción o emisión de energía provocada por la radiación electromagnética en el material de interés [85].

El equipo que se muestra en la Figura 19 presenta una fuente de luz de radiación infrarroja, que pasa a través de un interferómetro, después que una vez incidida el haz de luz pasa a través de un detector, el detector recibe todas las señales para formar un interferograma. La cual es una señal espectral que es posible interpretar utilizando la Transformada de Fourier a través de un software y por último se obtiene el espectro de las bandas características de la muestra analizada [85].



**Figura 19.** Equipo de FTIR

El mecanismo consiste en incidir un haz de luz IR sobre una muestra, provocando una absorción energética dando como resultado una oscilación vibracional de los electrones enlazantes del compuesto. El tipo de vibración presentada es característico de la cantidad de energía absorbida por los enlaces, la cual puede ser de tensión, estiramiento y flexión, con resolución de  $10\text{ cm}^{-1}$  en el intervalo espectral de  $900\text{-}5000\text{ cm}^{-1}$  [86] así como se muestra en la Figura 20 donde se aprecia el diagrama general del funcionamiento del FTIR. Esta técnica es utilizada para obtener información de los grupos funcionales y/o presencia de óxidos metálicos presentes en una muestra de interés.



**Figura 20.** Diagrama del funcionamiento general del FTIR [87]

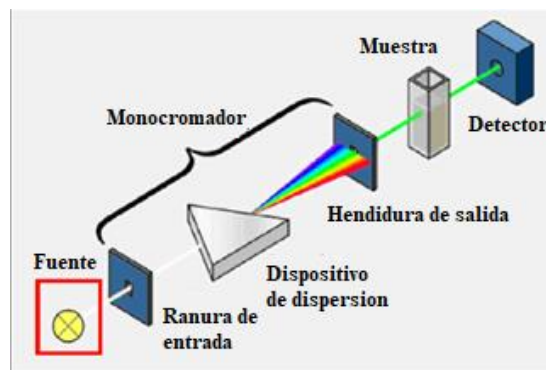
### 3.5. Espectroscopia de UV visible (UV-Vis):

La espectroscopia UV-Vis que se observa en la Figura 21 se basa en el análisis de la cantidad de radiación electromagnética en el espectro visible, basado en la propiedad que presenta al absorber o transmitir una muestra en función de la cantidad de sustancia presente [88].



**Figura 21.** Equipo de espectroscopia de UV-Visible

La espectroscopia de UV-Vis se encuentra relacionada con la interacción de la radiación y la materia, su funcionamiento consiste en la incidencia de un haz de luz (entre 200 y 800nm), la cual es incidida a través de una muestra la cual absorberá una cantidad de luz específica, esta última es procesada por un software para su posterior análisis. Cuando la muestra es incidida se da una absorción de energía que provoca que los electrones de su última capa de valencia pasen de un estado basal a un estado excitado, provocando una liberación de energía electromagnética la cual es recibida por un detector [89] como se ilustra en la Figura 22, donde se muestra el funcionamiento de este equipo, el cual es utilizado para estimar morfología y concentración de una muestra de interés.



**Figura 22.** Diagrama de funcionamiento de equipo UV-Vis [90]

Con la técnica anteriormente mencionada (UV-Vis) es posible evaluar concentraciones, para ello, es utilizada la absorbancia definida como  $A = -\log(T)$ , donde T representa la transmitancia de la luz la cual es la relación que existe entre la cantidad de luz detectada que pasa a través de una muestra ( $I_t$ ) y la cantidad de luz inicial incidida ( $I_o$ ), se presenta porcentualmente como se muestra a continuación:

$$\%T = \frac{I_t}{I_o} \times 100$$

La transmitancia y absorbancia son relacionadas de manera que, al tener una luz incidente igual a la transmitida a través de una muestra, se presenta una transmitancia del 100% mientras una absorbancia nula, al tener relación entre la absorbancia y la concentración de una muestra se planteó la ley de Lambert-Beer, la cual establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración del analito en la solución, está dada por:

$$A = \epsilon cl$$

## Donde

$A$ : Absorbancia medida (adimensional)

$\epsilon$ : Coeficiente de extinción molar (depende de  $c$  y  $l$ , comúnmente  $M^{-1}cm^{-1}$ )

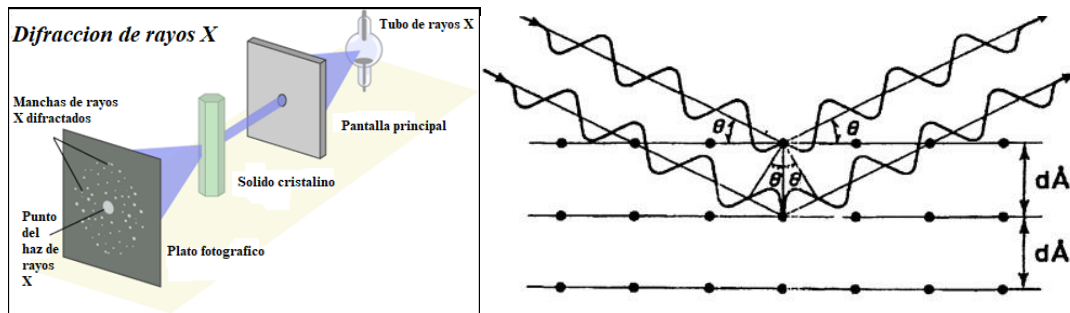
$c$ : Concentración de la sustancia absorbente (comúnmente en  $M$ )

$l$ : Longitud del camino óptico (comúnmente en  $cm$ )

De acuerdo con esta ley es posible estimar la concentración de una muestra medida a través de UV-Vis de acuerdo a su absorbancia, donde a mayor cantidad existe una mayor interacción con la luz incidente que recorre una distancia específica, definida como longitud del camino óptico, en esta a una distancia mayor se tendrá una mayor interacción; además, esta ley hace mención del coeficiente de extinción molar, misma que representa la cantidad de luz absorbida por una muestra en una longitud de onda específica del analito (M. Castro, 2009), es por ello que esta ley suele relacionarse para obtener o estimar la concentración de algunas muestras, tales como las NPs, las cuales actualmente tienen una gran importancia en diversos sectores, sin embargo, el obtener estas partículas trae consigo un alto costo de producción, así también un alto grado de contaminación debido por el uso desmedido de reactivos químicos, por ello surgen algunas alternativas más amigables con el medio ambiente como la química verde, el cual es una rama de la química que se basa en el uso de materia prima natural o procesos naturales para promover una reacción química sin hacer uso de sustancias altamente reactivas o contaminantes [91].

### 3.6.Difracción de Rayos X (DRX):

Los rayos X son ondas electromagnéticas que se producen debido a la desaceleración de los electrones cuando colisionan sobre una superficie, los cuales son de elevada energía y longitud de onda que va de 0.5 hasta 2.5 Angstrom, este tipo de radiación es utilizada en la caracterización de materiales por difracción de rayos X. Se le conoce como difracción de rayos X (DRX) a la dispersión elástica de los fotones de rayos X monocromáticos en una red periódica, los cuales están dispersos en fase generando una interferencia constructiva, permite derivar espacios en celosía utilizando la ley de Bragg como se muestra en la Figura 23, en donde se ilustra la difracción de rayos X de los planos del cristal utilizando la ley de Bragg [92].



**Figura 23.** Difracción de rayos X con respecto a la ley de Bragg [92].

La ley de Bragg hace mención que durante la DRX un haz de rayos X monocromáticos incidirá sobre un cristal de planos atómicos paralelos, separados por una distancia  $d$ , el haz de luz incidente formara un ángulo  $\Theta$  sobre los planos atómicos, por lo tanto solo se obtendrán haces difractados cuando las reflexiones en los sucesivos planos paralelos interfieran de forma aditiva, lo cual tiene lugar cuando la diferencia de trayectoria entre los rayos reflejados por dos planos adyacentes sea un múltiplo entero de su longitud de onda  $\lambda$ , es decir:

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

La difracción de rayos X, corresponde a una técnica de análisis no destructiva utilizada para identificar la y fase/composición que distinguen los compuestos presentes en una muestra cristalina [93].

Los materiales cristalinos presentan un ordenamiento de sus átomos en el espacio de forma repetitiva, lo cual se define como celda unitaria, donde existen 7 sistemas cristalinos, de los cuales destacan principalmente las estructuras hexagonales, cúbicas y monoclinicas, entre otras [94].

DRX además proporciona información importante de materiales cristalinos, como su estructura, cristalinidad, orientación de cristales, tamaño de cristal, entre otros. El tamaño de los cristales puede obtenerse a partir de la ecuación de Scherrer, la cual es una ecuación que relaciona el tamaño de los cristales submicrométricos en un sólido con el ancho de un pico en un patrón de difracción, la cual se muestra a continuación.

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

**Donde**

$d$ : es la dimensión de una partícula en la dirección perpendicular al plano reflectante

$\lambda$ : es la longitud de onda de los rayos X ( $\lambda = 0.15406 \text{ nm}$ )

$\beta$ : es el ancho del pico

$\theta$ : es el ángulo entre el haz

$K$ : es una constante que a menudo se toma como unidad

Los resultados obtenidos a partir del DRX incluyen el nombre común de la sustancia, fórmula química, sistema cristalino, y número de patrón de referencia, el equipo de DRX se muestra en la Figura 24. La información obtenida con esta técnica de caracterización es utilizada por industrias como la farmacéutica, industria del vidrio, aplicaciones geológicas, análisis de corrosión, entre otras [95].



**Figura 24.** Ejemplificación del equipo de DRX

---

*CAPÍTULO IV*

*SECCIÓN*

*EXPERIMENTAL*

---

## CAPÍTULO IV

### 4. Sección experimental

#### 4.1. Materiales

Para la síntesis de las nanopartículas de óxido de cobre se utilizó extracto de alga de *Gellidium rubostum*, misma que fue obtenida de la empresa algas pacific ubicada en la ciudad de Ensenada, Baja California. Como precursor metálico se utilizó sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) de sigma aldrich al 98% de pureza y para controlar el pH se usó hidróxido de sodio de sigma aldrich al 99% de pureza.

Para la obtención de la hidroxiapatita dopada con nanopartículas de óxido de cobre (Hap:NPsCuO), se utilizaron espinas del exoesqueleto de los erizos de mar (*S. purpuratus*), el cual fue utilizado como precursor de iones de calcio y como precursor de iones fosfato se utilizó ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) Jalmek 85% v/v y para el tratamiento térmico una mufla Furnace 4800.

Para los ensayos de actividad antimicrobiana se utilizó la cepa de *Escherichia coli* (x11 blue), para su aislamiento y cultivo se utilizó medio de cultivo LB (caldo de luria) y agar de BD diagnostic Difco Miller, para la esterilización del medio de cultivo se utilizó una autoclave y para el crecimiento bacteriano una incubadora a 37 °C. Como control positivo se utilizó como antibiótico ciprofloxacino de sigma aldrich al 99% de pureza.

#### 4.2. Métodos

##### 4.2.1. Obtención del extracto de alga *Gellidium rubostum*

Para la obtención del extracto de alga *Gellidium rubostum*, primero el alga se sometió a un proceso de secado en un horno de convección a 50 °C durante 2 horas. Posteriormente, el alga se colocó dentro de un vaso de precipitado de 1 litro con 700 ml de agua desionizada. Después, el vaso con el alga se colocó en una plancha térmica a una temperatura de 75-80 50 °C durante 1 hora. Por último, la solución resultante se filtró al vacío para separar las algas de la solución y posteriormente se almacenó durante 24 horas a temperatura ambiente para su uso posterior.

#### 4.2.2. Síntesis verde de las nanopartículas de óxido de cobre

La síntesis de nanopartículas de óxido de cobre (NPs CuO) se realizó mediante un método de química verde utilizando un extracto de alga *Gellidium rubostum* como agente reductor, debido a que el extracto contiene polifenoles que permite la reducción de iones metálicos. Para la síntesis de NPs CuO se utilizó 6 ml de extracto de alga con 2 ml del precursor metálico en este caso sulfato de cobre a una concentración de 0.3 M, la cual se mantuvo bajo agitación constante durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 0.5 ml de hidróxido de sodio (NaOH) con una concentración de 0.1M con el fin de obtener un pH de 7, ya que con este valor de pH se ha reportado la obtención de NPs CuO con mayor facilidad. Una vez que se agregó el NaOH, se dejó bajo agitación constante a temperatura ambiente durante dos horas. Cabe señalar que la solución obtuvo un cambio en la coloración de un color azul a un color café oscuro, el cual es característico de las NPs CuO, como se muestra en la Figura 25.

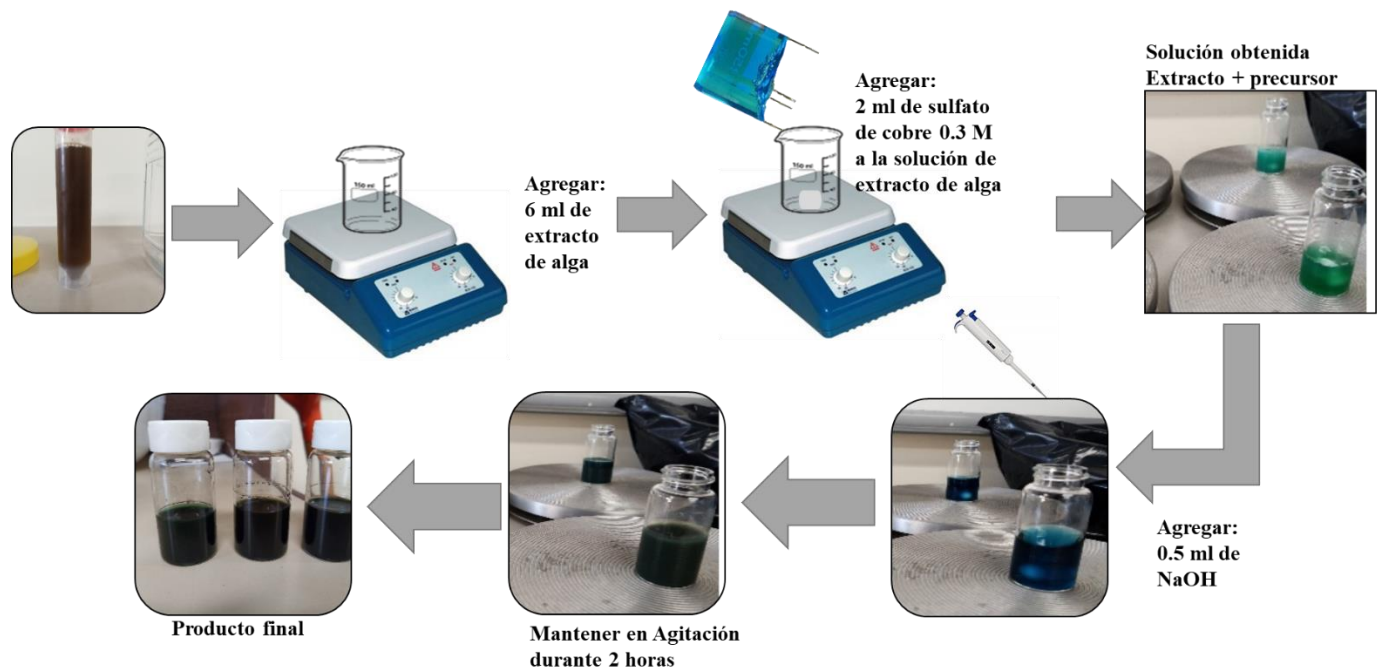


Figura 25. Proceso de síntesis de las nanopartículas de óxido de cobre

#### 4.2.3. Síntesis de la hidroxiapatita dopado con las nanopartículas de óxido de cobre

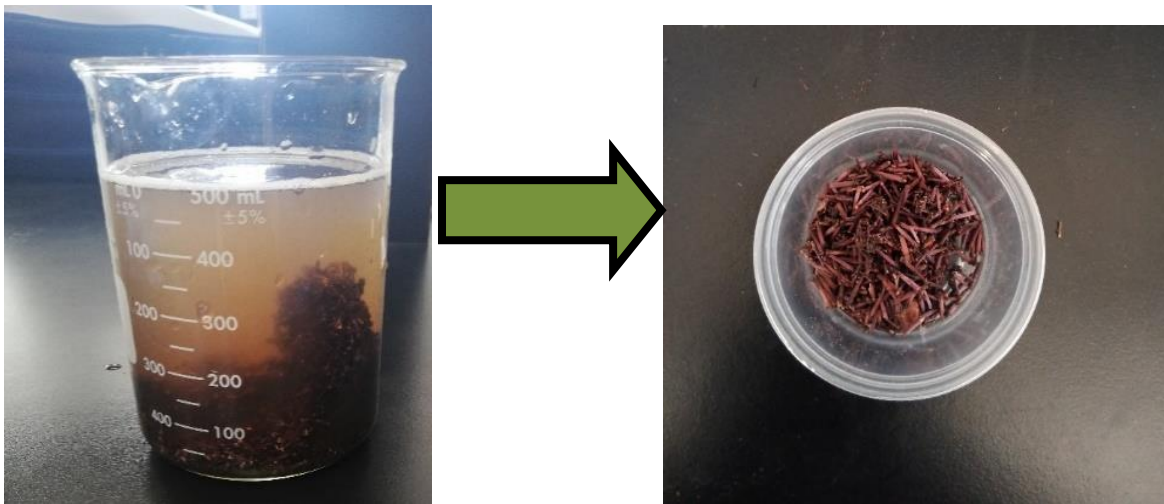
La síntesis de hidroxiapatita fue realizada siguiendo la metodología reportada en 2018 por Mancillas-Sánchez *et al.* [96]; para la obtención de este material fue necesario utilizar precursores

de iones de calcio y fosfato. Para la obtención de los iones de calcio, primero se limpiaron y tomaron las espinas de los erizos de mar, las cuales son ricas en carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) como se observa en la Figura 26.



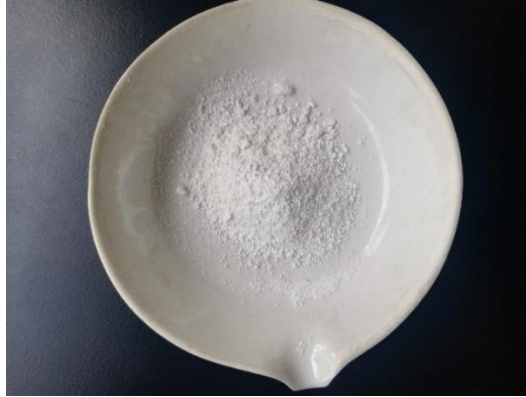
**Figura 26.** Limpieza del erizo de mar

Después, el caparazón obtenido se sometió a un lavado en agua destilada a  $80^\circ\text{C}$  durante 2 horas con el fin de eliminar contaminantes y facilitar la obtención de las espinas, este proceso se observa en la Figura 27.



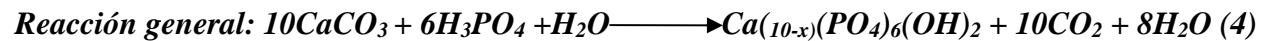
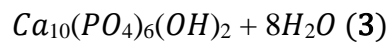
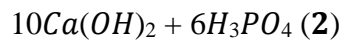
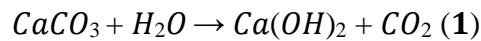
**Figura 27.** Lavado de las espinas del erizo de mar en agua destilada

Posteriormente, las espinas obtenidas se secaron en un horno de convección BINDER a  $100^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo de secado, se pesaron 5.2 gramos de las espinas de erizo de mar, las cuales fueron utilizadas para su molienda y tratamiento térmico a  $800^\circ\text{C}$  en una mufla Furnace 4800 durante 20 minutos con el propósito de eliminar cualquier presencia de material orgánico, además de la obtención del carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) como se observa en la Figura 28.

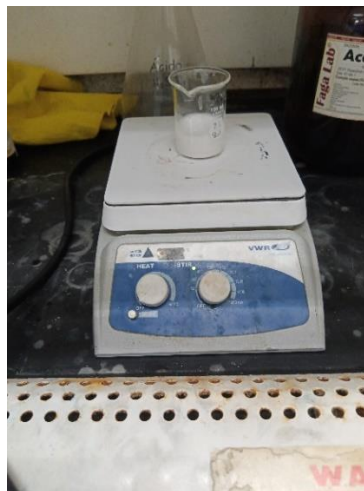


**Figura 28.** Obtención del carbonato de calcio

Para la síntesis de la hidroxiapatita, se realizaron cálculos estequiométricos para obtener la relación Ca/PO<sub>4</sub> adecuada, partiendo de la siguiente reacción:

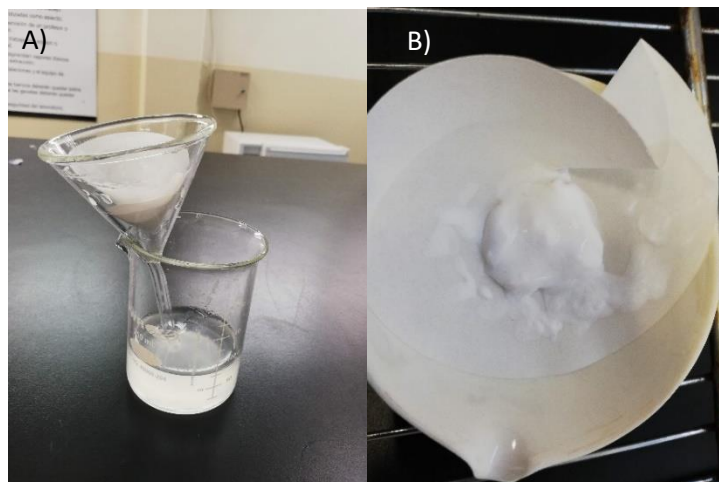


Una vez que se obtuvo la estequiometría adecuada, se mezcló el CaCO<sub>3</sub> sintetizado previamente, ácido fosfórico y diferentes concentraciones de nanopartículas de óxido de cobre (5, 10 y 15%), después la mezcla se dejó bajo agitación constante a una temperatura de 45 °C durante 18 horas, como se observa en la Figura 29.



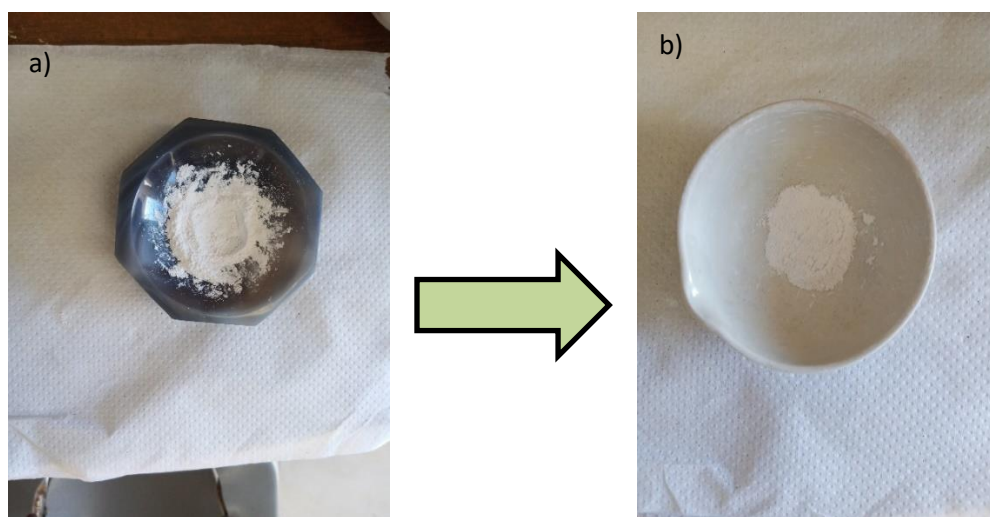
**Figura 29.** Adición de iones fosforo y sustitución de iones de calcio por medio de NPsCuO

Al finalizar la reacción, se filtró la mezcla utilizando un papel filtro Whatman tipo 3, realizando 3 lavados con agua destilada con el fin de obtener un pH cercano a 7, como se muestra en la Figura 30. Luego se realizó un secado a 100°C por 30 minutos para la eliminación del exceso de humedad.



**Figura 30.** Proceso de filtraje del material obtenido (a) filtraje y (b) material obtenido después del proceso anterior

Al terminar el secado de las muestras, se recuperó el material del papel filtro cuidadosamente evitando romper el papel y llevarse partes del mismo, ya que esto podría contaminar el producto final. Al terminar con la recolección de la muestra, esta fue colocada en un horno y se le dio un tratamiento térmico a 600°C durante 1 hora. Por último, el material obtenido se trituro con un mortero de ágata para evitar una contaminación cruzada, obteniendo un polvo blanco como se muestra en la Figura 31.



**Figura 31.** Material obtenido después del proceso de secado, a) molienda en mortero de ágata para la pulverización de la muestra de Hap sintetizada, b) producto obtenido

#### **4.2.4. Caracterización**

Los materiales obtenidos fueron caracterizados por medio de: Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) para conocer los grupos funcionales presentes en los materiales; Difracción de Rayos X (XRD) para el estudio de la estructura cristalina; Microscopia Electrónica de Barrido- Espectroscopia de Rayos X (SEM-EDS) para el estudio de su morfología y composición química; Microscopia Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM) para el estudio de su tamaño, forma y estructura; y Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-Vis) para el estudio la banda de resonancia de plasmon superficial.

##### **Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier**

Los espectros FT-IR se obtuvieron con un Espectrofotómetro Infrarrojo Spectrum Two (Perkin Elmer) con detector directo en modo de transmitancia y una resolución de  $0.5 \text{ cm}^{-1}$ . Las muestras fueron previamente molidas con un mortero de ágata y se analizaron en modo de Reflectancia Total Atenuada Horizontal (UATR) a temperatura ambiente ( $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Los espectros se consiguieron usando Spectrum en la versión 6.0 del software Lab. Antes y después de cada análisis, se tomó de referencia un nuevo espectro de fondo del aire.

##### **Difracción de Rayos X**

Los estudios de difracción de rayos X se llevaron a cabo utilizando un difractómetro de rayos X, D2-Phaser, Bruker. Las muestras se agregaron en un soporte, que se colocó en una placa de cuarzo para la exposición a la radiación Cu K- $\alpha$  con una longitud de onda de  $1.5406 \text{ \AA}$ . Este equipo trabajó a 30 kV, 10 mA en un rango  $2\theta$  de  $10\text{-}70^\circ$ , con un tamaño de paso de  $0.02^\circ$  y un tiempo de recuento de 1 s/paso.

##### **Microscopia Electrónica de Transmisión de Alta Resolución**

Las muestras se caracterizaron usando un microscopio JEOL JEM 2100F que operó con un voltaje de aceleración de 200 kV, donde se obtuvieron imágenes TEM de alta resolución. La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera: primero se dispersaron en agua desionizada con ayuda de un ultrasónico, después se depositaron un par de gotas de las muestras obtenidas sobre una rejilla de Cu revestida con carbón perforado y por último se dejaron secar para posteriormente ser analizadas.

## **Microscopio Electrónico de Barrido-Espectroscopia de Dispersión de Energía de rayos X**

Las muestras se prepararon de la misma manera que para los análisis de TEM. Para estos análisis se utilizó un equipo JEOL JSM-6510LV, con voltaje de aceleración de 1 a 30 kV y un filamento de tungsteno. Este equipo utilizó un detector de electrones secundarios, con una resolución máxima de 5nm en modalidad de alto vacío. Se obtuvieron micrografías con magnificaciones de 30x a 300,000x. Se realizó un análisis químico por medio de un detector de dispersión de energía (EDS) marca OXFORD que tiene acoplado el SEM, con una resolución de 137 eV.

## **Espectroscopia Ultravioleta-visible**

Para el análisis de banda de resonancia de plasmon superficial se preparó una dilución de la muestra a una concentración 1% v/v en agua desionizada, la cual se llevó al ultrasónico por 180 segundos, con la finalidad de promover una mayor dispersión en el medio. Para el análisis de estas muestras se realizó un barrido a la longitud de onda de 200 a 800 nm, haciendo barrido de fondo con agua desionizada, la cual se realizó en una celda de cuarzo de 0.7 ml, en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 365.

### **4.2.5. Ensayos de actividad antimicrobiana**

Los ensayos de actividad bactericida in vitro se llevaron a cabo mediante el uso de un método de difusión de disco, con la cepa bacteriana de *Escherichia coli*, en este caso es específico la cepa x11blue *E. Coli*, cultivada en medio de cultivo agar LB.

Para la preparación del medio de cultivo fue necesario disolver 40 gramos de medio de cultivo en 1 litro de agua destilada, para posteriormente llevar a esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, después de esterilizar se dejó enfriar hasta llegar a una temperatura aproximada de 50 °C y después verter sobre las placas Petri esperando a que solidifique, posteriormente se realizó el cultivo bacteriano, para ello esta cepa fue sembrada en una caja Petri e incubada por 16 horas a 37°C, al finalizar este tiempo, la caja Petri fue retirada de incubación y almacenada en refrigeración para frenar su crecimiento, además, se realizó un medio líquido LB para aislar y crecer en mayor cantidad la *E. Coli*, este inóculo se realizó tomando una muestra de las bacterias crecidas en medio sólido con ayuda de un asa bacteriológica como se muestra en la Figura 32.



**Figura 32.** Ensayos de inhibición antimicrobiana

Una vez aisladas las bacterias se comenzaron con los ensayos microbiológicos, para ello se prepararon cajas Petri con medio agar LB todo esto en condiciones estériles y cuidando la técnica aséptica, una vez preparadas, las cajas se dividieron en secciones (antibiótico (ciprofloxacina) al 10%, solución Hap, nanopartículas 100%, 10%, 1 %, y 0.1% y nitrato de plata), continuando con la siembra de bacterias agregando 100 $\mu$ l de bacterias en el centro de la caja Petri y después ser esparcida utilizando un asa bacteriológica, al finalizar la siembra, se colocó un sensidisco de 5mm de diámetro en cada sección, a cada sensidisco se añadió 5 $\mu$ l de las muestras anteriores.

---

*CAPÍTULO V*

*RESULTADOS*

---

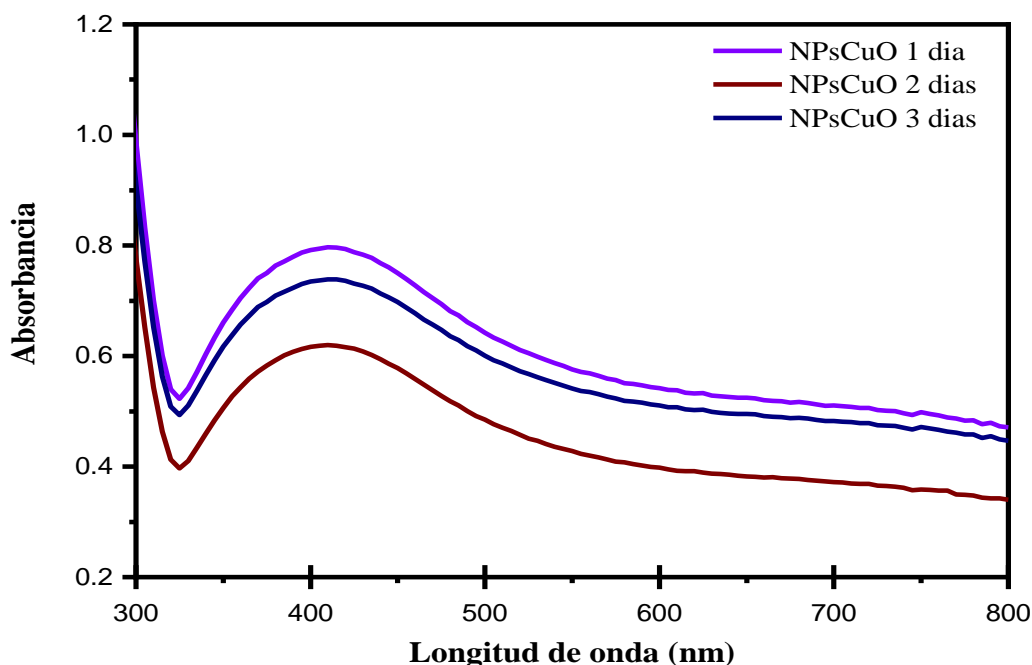
## CAPÍTULO V

### 5. Resultados

#### 5.1. Nanopartículas de óxido de cobre

##### 5.1.1. Espectroscopia de Ultravioleta visible

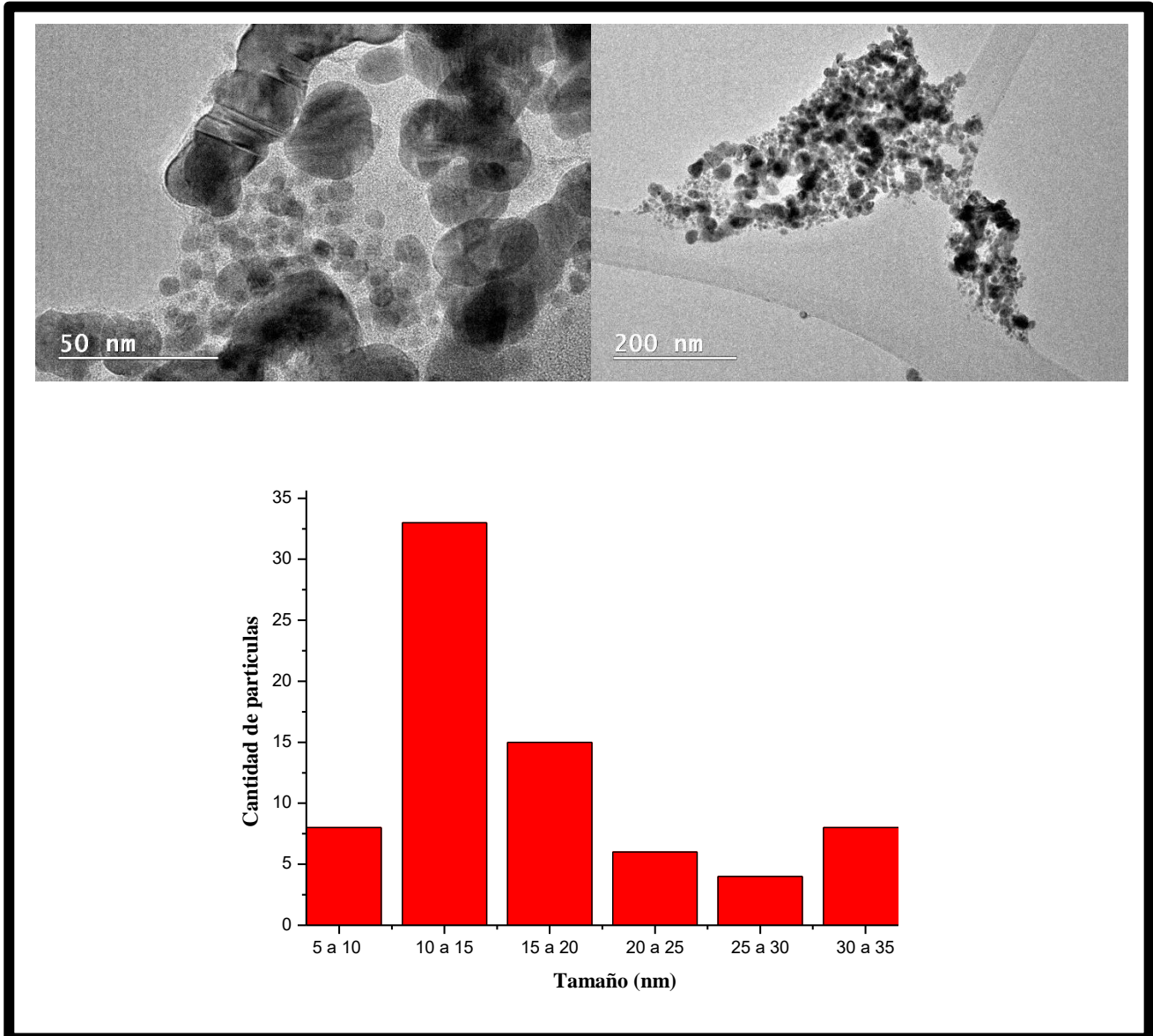
Para la caracterización de las nanopartículas después haber sido sintetizadas se realizó un estudio por medio de espectroscopía por ultravioleta visible (UV Vis) con un barrido de 200 a 800 nm, esto debido a que las nanopartículas de óxido de cobre presentan una banda de resonancia entre los 250 a 600 nm, el cual depende de su tamaño y morfología según lo publicado en la literatura [97]. En la Figura 33 se muestra los espectros UV-vis de NPsCuO con diferentes tiempos de reacción a 1, 2 y 3 días de reacción después de su agitación, con el fin de evaluar una posible inestabilidad de las NPs, con lo que de acuerdo a la Figura 33 no se mostró ningún cambio significativo, por lo que indica una estabilidad de las nanopartículas sin formar aglomerados donde se observa la presencia del plasmón superficial a los 415 nm, la cual se asocia a la formación de NPsCuO con tendencia a una morfología esférica, para las todas las muestras sintetizadas [98].



**Figura 33.** Factor de resonancia de plasmón superficial para NPsCuO en UV Vis

### 5.1.2. Microscopia Electrónica de Transmisión

Con la finalidad de comprobar morfología y tamaños de las nanopartículas se realizó la caracterización por medio de Microscopia Electrónica de Transmisión para todas las muestras. Las micrografías TEM muestra la presencia de nanopartículas con una morfología esférica y con una tendencia a formar algunos aglomerados, tal como se esperaba de acuerdo al análisis por UV vis y una distribución de tamaños que se encuentra entre 10 a 40 nm como se muestra en la Figura 34.



**Figura 34.** Micrografías y análisis de tamaños de nanopartículas por medio de TEM

### 5.1.3. Propuesta de mecanismo de reacción durante la síntesis de NPsCuO

Para poder explicar el proceso de reducción metálica en la síntesis de nanopartículas se plantea la ecuación general que se muestra a continuación (Figura 35), teniendo como precursor metálico ( $CuSO_4$ ) y agente reductor ácido gálico ( $C_7H_6O_5$ ) en concentraciones equimolares.

De forma general un método típico de síntesis de nanopartículas se divide en tres etapas: 1) nucleación, 2) la formación de semillas a partir de los núcleos y 3) crecimiento de las semillas.

En el mecanismo de nucleación, un precursor es reducido para generar átomos con estado de oxidación cero. De acuerdo a la naturaleza de los átomos y los precursores a utilizar, el proceso de nucleación puede tomar diferentes rutas. De forma general en la biosíntesis de nanopartículas de óxido de cobre, las biomoléculas presentes en los extractos de alga actúan como agentes de ligadura sobre el precursor metálico, posteriormente los grupos hidroxilo (OH) aromáticos de las biomoléculas forman un complejo con los iones de cobre lo que da inicio al proceso de nucleación mencionado anteriormente, lo que luego da como resultado la reducción y conformación de las nanopartículas de óxido de cobre, al ser reducido el cobre suele ser susceptible a oxidación, por lo que este toma una ruta alterna para la nucleación. En este sentido a medida que el precursor se reduce, la concentración de los átomos metálicos aumenta con el tiempo y comienza a oxidarse la superficie promoviendo la formación de nanopartículas de óxido de cobre [99-100].

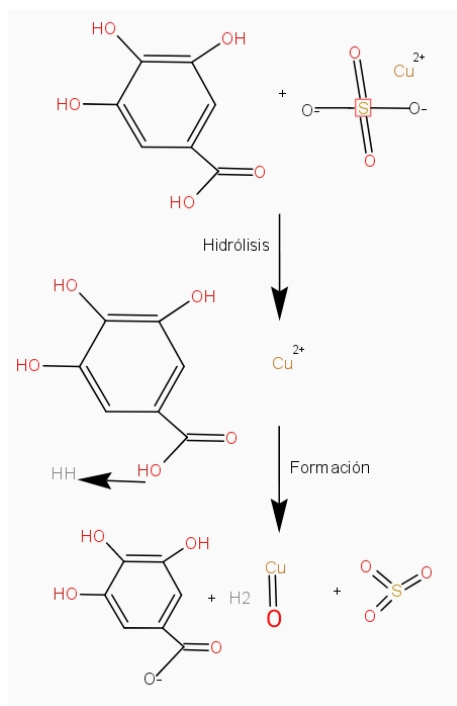
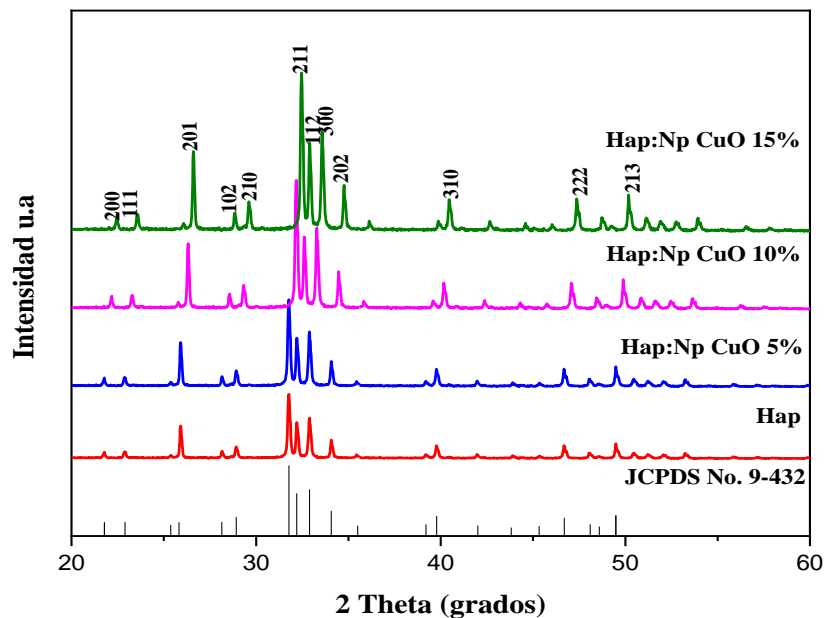


Figura 35. Diagrama del mecanismo de reacción de la síntesis de nanopartículas de óxido de cobre

## 5.2. Hidroxiapatita dopada con nanopartículas de óxido de cobre

### 5.2.1. Difracción de Rayos X

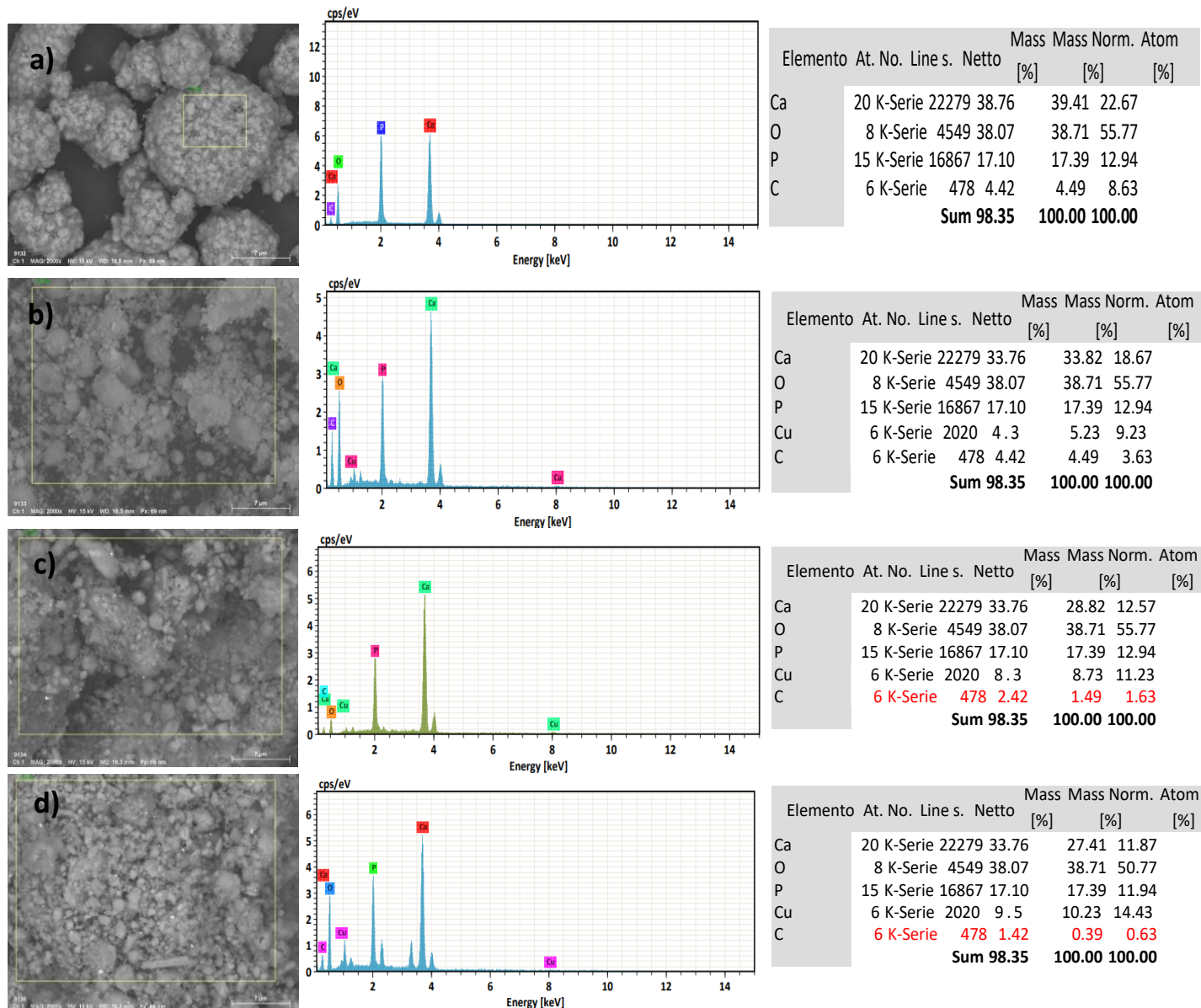
Después de la síntesis de la hidroxiapatita dopada con nanopartículas de óxido de cobre se realizó la caracterización por difracción de rayos-X con la finalidad de conocer la estructura cristalina del material sintetizado. En la Figura 36 se muestran los patrones de difracción de las muestras Hap, Hap:Np CuO 5%, Hap:Np CuO 10% y Hap:Np CuO 15%. En el patrón de difracción del Hap se observa los planos cristalinos (índices de Miller) (200), (111), (201), (102), (210), (211), (112), (300), (202), (310), (222) y (213), para los ángulos 21.819, 22.902, 25.354, 28.126, 28.966, 31.773, 32.196, 32.902, 34.048, 39.818, 46.711 y 49.468, respectivamente. Estos planos cristalinos son característicos de una estructura hexagonal correspondiente a la hidroxiapatita de acuerdo con la carta cristalográfica JCPDS No. 9-432. Estos resultados nos indican que se obtuvo con éxito el material deseado [101]. Mientras que los patrones de difracción de las muestras Hap:Nps CuO con 5, 10 y 15%, se observan los mismos planos cristalográficos que para la muestra Hap. Sin embargo, se observa un aumento y un desplazamiento de los principales planos cristalográficos (211), (112), (300) y (202) conforme aumenta el porcentaje de las Nps CuO en la síntesis de Hap. Esto se puede atribuir a la presencia de las nanopartículas de óxido cobre dentro de la red cristalina del Hap [102], lo que nos indica que se llevó con éxito el dopado del Hap utilizando Nps CuO.



**Figura 36.** Patrones de difracción de la hidroxiapatita sin y con diferentes concentraciones de Nps CuO.

### 5.2.2. Microscopio Electrónico de Barrido-Espectroscopia de Dispersión de Energía

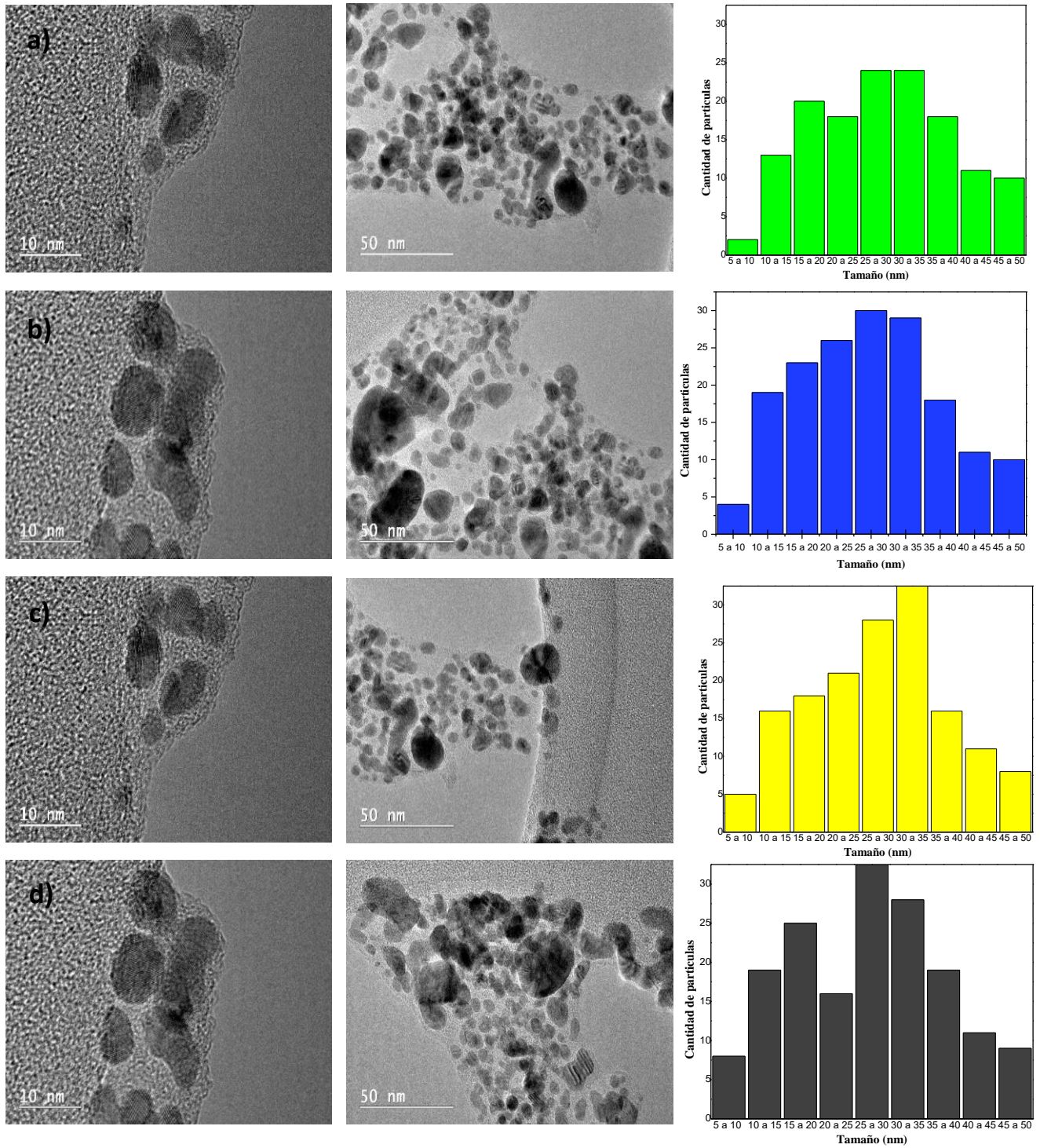
La Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) fue utilizada para determinar la morfología y la Espectroscopía de rayos X de Energía Dispersiva (EDS) para determinar la composición elemental cualitativa y cuantitativa de las muestras Hap, Hap:Nps CuO5%, Hap:Nps CuO10% y Hap:Nps CuO15% como se puede observar en la Figura 37. En la muestra Hap se observan una morfología irregular característica de la hidroxiapatita con diferentes tamaños y longitudes de menores a 2  $\mu\text{m}$ , con una tendencia a formar aglomeraciones. Además, en el espectro EDS se muestra elementos como el Calcio, Fosforo y Oxígeno, los cuales son elementos característicos de la hidroxiapatita con una relación Ca/P de 1.67, siendo esta relación la que se encuentra naturalmente en los seres vivos [103]. Mientras que para las muestras Hap:Nps CuO con 5, 10 y 15% se observa una morfología irregular pero con una menor aglomeración en comparación con la muestra Hap. Además, en los espectros EDS se observa los elementos calcio, fosforo y oxígeno que pertenecen al HAp y el cobre que se atribuye a las nanopartículas, lo cual nos indica que las Nps CuO se encuentran en el Hap. Mientras que la relación Ca/P son de 1.44, 0.97 y 0.99 para las muestras de Hap:Nps CuO con 5, 10 y 15%, respectivamente. Estos resultados nos confirman el dopado de la hidroxiapatita con las Nps CuO, debido a que se observa una disminución en la relación Ca/P lo que nos indica que el Cu está ocupando el lugar del Ca en la estructura de la hidroxiapatita.



**Figura 37.** Morfología y análisis químico cualitativo y cuantitativo de las diferentes muestras, a) Hap, b) Hap:Np CuO 5%, c) Hap:Np CuO 10% y d) Hap:Np CuO 15%.

### 5.2.3. Microscopía Electrónica de Transmisión

La Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) fue utilizada para determinar la morfología y distribución de tamaño de las muestras Hap, Hap:Nps CuO5%, Hap:Nps CuO10% y Hap:Nps CuO15% como se puede observar en la Figura 38. En las micrografías de la muestra Hap se observan partículas con tendencias a formar aglomeraciones y con una morfología irregular. Además de acuerdo a los análisis de distribución de tamaños se presentaron partículas con tamaños promedio de 25 a 35 nm aproximadamente, la cual se asocia al método de síntesis utilizado para la Hap [104]. Para la micrografía correspondientes a la muestra Hap:Nps CuO 5%, se observan partículas con tendencias a formar aglomeraciones y con una morfología irregular tal y como se muestra para la muestra Hap. Sin embargo, para estas morfologías se observa una mayor tendencia a aglomerarse, de acuerdo a los análisis de distribución de tamaños se presentaron partículas con tamaños promedio de 25 a 35 nm aproximadamente. Mientras que las micrografías correspondientes a las muestras Hap:Nps CuO con 10 y 15%, se observan partículas con una tendencia mayor a aglomerarse con respecto a sus homologas anteriores y con una morfología irregular. De acuerdo a los análisis de distribución de tamaños se presentaron partículas con tamaños promedio de 25 a 35 nm aproximadamente, sin embargo, para estas micrografías se presentan una mayor cantidad de partículas con tamaños superiores a los 35 nm, lo cual puede ser ocasionado debido a una mayor concentración de NPs CuO.



**Figura 38.** Micrografías por TEM, alta resolución y distribución de tamaño de partículas de las muestras, a) Hap, b) Hap:NPs CuO 5%, c) Hap:NPs CuO 10%, d) Hap:NPs CuO 15%

#### 5.2.4. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 39 se muestra los espectros de FTIR de las muestras Hap comercial, Hap, Hap:Nps CuO5%, Hap:Nps CuO10% y Hap:Nps CuO15%. El espectro FTIR de la muestra Hap se observan las bandas características de la hidroxiapatita como son los grupos carbonato, los cuales se presentan a los 962 y 1091  $\text{cm}^{-1}$  y se asocian a la presencia del calcio en la muestra. También, se muestra la presencia de bandas de absorción a 601, 633 y 1026  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales se atribuyen a los grupos fosfatos que también son característicos de la Hap. Cabe mencionar que todas las bandas de absorción para la muestra de Hap son idéntica que para la muestra Hap comercial, lo que significa que la hidroxiapatita se sintetizó con éxito. Mientras que los espectros FTIR de las muestras Hap:Nps CuO con 5%, 10% y 15%, se observan las bandas antes mencionadas que para el HAp, además de presentar una banda de absorción a los 526  $\text{cm}^{-1}$ , lo cual se asocia a la presencia del enlace metal-oxígeno y se atribuye a la presencia de nanopartículas de óxido de cobre [105]. De acuerdo con los resultados anteriores se observa que a medida que aumenta la concentración de NPs en la muestra los espectros de absorción se muestran con una mayor intensidad y pequeño ensanchamiento de las bandas, lo cual puede asociarse a cambios en la estructura molecular por la presencia de nanopartículas de óxido de cobre [106].

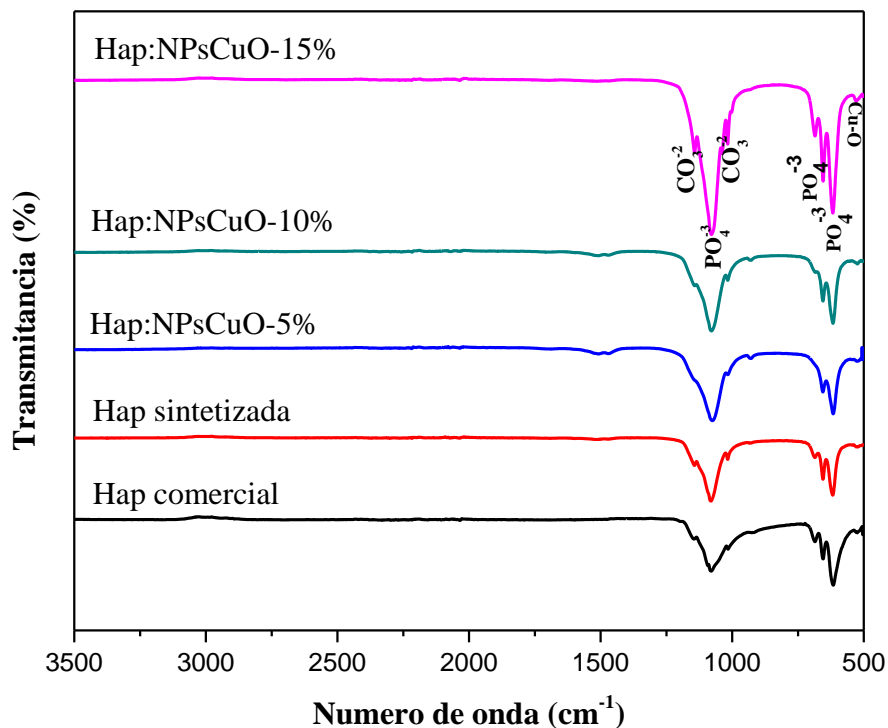
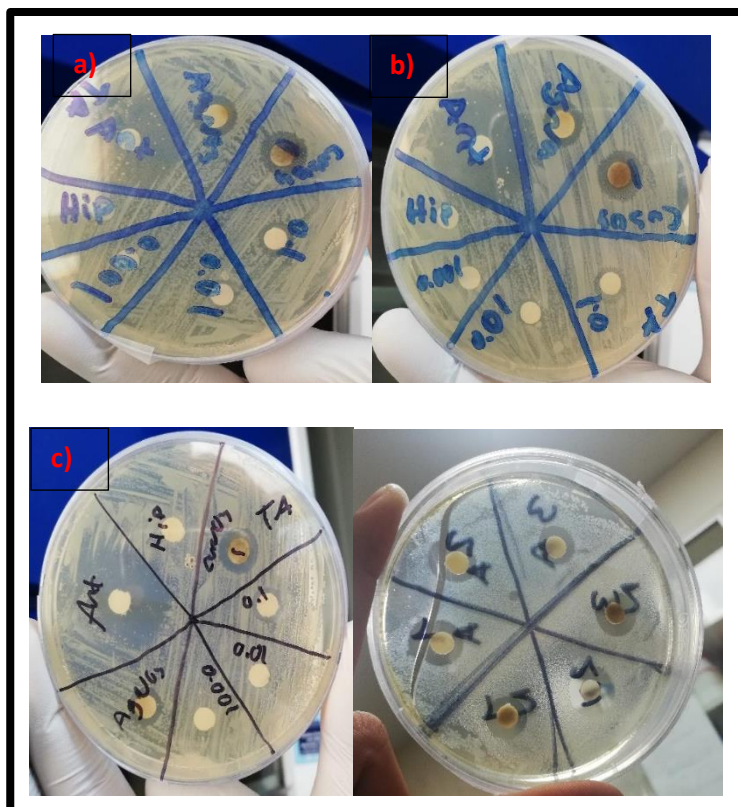


Figura 39. Espectros de FTIR para todas las muestras sintetizadas en este trabajo.

### 5.3. Actividad antimicrobiana

Para la realización de los ensayos antimicrobianos las cajas petri se dividieron en secciones (ciprofloxacino al 10%, solución Hap, nanopartículas 100%, 10%, 1 %, y 0.1% y nitrato de plata), continuando con la siembra de bacterias agregando 100µl de bacterias en el centro de la caja Petri y después ser esparcida con un asa bacteriológica, posteriormente se colocó un sensibilizador de 5mm de diámetro en cada sección, y se le agregó 5µl de las muestras anteriores, obteniendo los resultados que se muestran en la Figura 40.



**Figura 40.** Actividad antimicrobiana por difusión de disco, en a) Hap:NPs 5%, b) Hap:NPs 10% y c) Hap:NPs 15%. Como se muestra en la Figura 40 las nanopartículas en solución al 1, 10 y 100% presentan una notoria y favorable actividad bactericida, sin embargo, las muestras asociadas a Hap:NPs 5% presentan una actividad menor a las restantes, lo cual puede asociarse a la concentración utilizada para su preparación.

**Tabla 4.** Resultados de ensayos de actividad bactericida

Material	Mediciones de los halos de inhibición resultantes						
	NPCuO (1)	NPCuO (0.1)	NPCuO (0.01)	NPCuO (0.001)	AgNO3	Antibiótico	Hap
Hap:NPs 5%	2.8 mm	1.3mm	1.1mm	0.8 mm	2mm	1 cm	0mm
Hap:NPs 10%	3.2 mm	1.8mm	1.3mm	1 mm	2mm	1.2cm	0mm
Hap:NPs 15%	3.33mm	2mm	1.4 mm	1.1mm	2.2mm	1.1cm	0mm

---

*CAPÍTULO VI*

*CONCLUSIONES*

---

## CAPÍTULO VI

### 6. Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente, es posible concluir que la síntesis de hidroxiapatita a partir de espinas de erizo de mar se realizó de forma exitosa, obteniendo el patrón de difracción característico de la Hap, y una relación molar Ca/P de 1.65 la cual se encuentra por naturaleza en el cuerpo humano.

La obtención del material de Hap dopada con nanopartículas de óxido de cobre se realizó de forma exitosa y con un grado de pureza considerable, lo cual se comprueba con la comparación de los DRX obtenidos y su carta cristalográfica obteniendo un material de color beige asociado al color característico de las nanopartículas, el cual como se mencionó anteriormente presento dentro de las caracterizaciones por XRD un desplazamiento en el plano cristalino de la misma manera un aumento de la intensidad en el patrón de difracción, lo cual se asocia a la presencia de las NPs dopantes (CuO) dentro de la red cristalina del material original, generando un desplazamiento de los iones de calcio.

El material obtenido presento los grupos funcionales característicos de la Hap, lo que indica que el método de síntesis utilizado fue el indicado para su obtención, esto se corrobora de acuerdo con las caracterizaciones realizadas por espectroscopía por transformada de Fourier (FTIR), presentan las bandas de absorción correspondientes a los grupos funcionales presentes en el material, no obstante, se presentó una vibración en los  $520\text{cm}^{-1}$  el cual está asociado al enlace metal oxígeno, para este caso en específico se asocia a la presencia de óxido de cobre.

De acuerdo con los resultados obtenidos por ultra violeta visible se presentaron nanopartículas de óxido de cobre con una banda de resonancia de plasmón superficial en los 415 nm, la cual se asocia a nanopartículas de óxido de cobre con morfología esférica y tamaños de 15 a 30 nm, lo cual se corrobora con las caracterizaciones por TEM.

Se obtuvieron NPsCuO con tamaños que van desde los 10 a los 15 nm, lo cual se comprueba por las micrografías obtenidas por el microscopio electrónico de transmisión que demostraron una formación cuasi esférica de nanopartículas de cobre, con tamaños promedio de 15 nm lo cual se

asocia al tiempo de reacción utilizado, el cual permitió un mayor crecimiento de partículas en solución.

La concentración de precursor metálico durante la síntesis de NPs afecta directamente en el tiempo de reacción y tamaño de las partículas, ya que a concentraciones altas de precursor metálico los tiempos aumentan a 4 horas de reacción promoviendo la generación de nanopartículas pequeñas, lo cual se comprobó durante los ensayos de síntesis de NPs.

El control de las temperaturas durante el proceso de dopado de hidroxiapatita es primordial para obtener mejores resultados, en temperaturas inferiores a 40 grados no se logró un dopado del material debido a que el cobre no logro sustituir en la red cristalina a los iones de calcio, mientras que a temperaturas mayores a 40 grados se dio de forma correcta, esto se comprobó por los análisis de XRD a las muestras obtenidas.

Las muestras de Hap:NPs CuO en concentraciones de 10 y 15 % presentaron una mayor actividad bactericida lo cual se asocia a una mayor concentración de partículas en comparación con la muestra de 5%, la cual presento actividad bactericida, sin embargo, menor a las anteriores.

---

*CAPÍTULO VII*

*REFERENCIAS*

---

## CAPÍTULO VII

### 7. Referencias

[1] **Ajay Vasudeo R, et al.**, (2018), *Synthesis of Inorganic Nanomaterials. Methods for Synthesis of Nanoparticles and Fabrication of Nanocomposites*. Woodhead Publishing, p.p. 121-139.

[2] **Mahmoud Nasrollahzadeh, et al.**, (2019), *Applications of Nanotechnology in Daily Life*. Interface Science and Technology. Vol. 28, p.p. 113-143.

[3] **Rosa Busquets, Lubinda M.**, (2017), *Emerging Nanotechnologies in Food Science. Concepts of Nanotechnology*. Elsevier, p.p. 1-6.

[4] **Sreeju. N., et al.**, (2016), *Microwave-assisted rapid synthesis of copper nanoparticles with exceptional stability and their multifaceted applications*. Journal of Molecular Liquids, Vol. 221, p.p. 1008-1021

[5] **Azade Yelten-Yilmaz, Suat Yilmaz**, (2018), *Wet chemical precipitation synthesis of hydroxyapatite (HA) powders*. Ceramics International. Vol. 44, p.p. 9703-9710

[6] **Nudelman F, Sommerdijk**, (2012). *Biom mineralization as an inspiration for materials chemistry*. Angew Chem Int Ed., Vol. 52, p.p. 82–96.

[7] **Aleksandra Szcześ, et al.**, (2017), *Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications*, Advances in Colloid and Interface Science. Vol. 249, p.p. 321-330

[8] **Jiang S-D, Yao Q-Z, Ma Y-F, Zhou G-T, Fu S-Q**, (2016). *Phosphate-dependent morphological evolution of hydroxyapatite and implication for biomineralisation*. Gondw Res; Vol. 8, p.p. 58–68.

[9] **Xiao W., Sonny Bal B, Rahaman MN.** (2016), *Preparation of resorable carbonate-substituted hollow hydroxyapatite microspheres and their evaluation in osseous defects in vivo*. Mater Sci Eng C. Vol. 3, p.p. 24–32.

[10] **Kolmas J, Krukowski S, Laskus A, Jurkitewicz M.** (2016), *Synthetic hydroxyapatite in pharmaceutical applications*. Ceram Int, Vol. 24 p.p. 72–87

- [11] **Sadat-Shojai, M., et al.**, (2013). *Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures*. *Acta Biomaterialia*, Vol. 9, p.p. 7591–7621.
- [12] **Miculescu, F., Maidaniuc, A., Voicu, S. I., Thakur, V. K., Stan, G. E., & Ciocan, L. T.** (2017). *Progress in Hydroxyapatite–Starch Based Sustainable Biomaterials for Biomedical Bone Substitution Applications*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, Vol. 5(10), p.p. 8491–8512.
- [13] **Fihri, A., Len, C., Varma, R. S., & Solhy, A.** (2017). *Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis*. *Coordination Chemistry Reviews*, Vol. 347, p.p. 48–76.
- [14] **Mary, I. R., et al.**, (2016). *Novel multiform morphologies of hydroxyapatite: Synthesis and growth mechanism*. *Applied Surface Science*, Vol. 361, p.p. 25–32.
- [15] **Shi, P., Liu, M., Fan, F., Yu, C., Lu, W., & Du, M.** (2018). *Characterization of natural hydroxyapatite originated from fish bone and its biocompatibility with osteoblasts*. *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 90, p.p. 706–712.
- [16] **J. Pérez Gonzales**, (2012), *Síntesis de Biovidrios por la Técnica SOL-GEL con Incorporación de Metales y Estudio de sus Propiedades Antibacteriales*, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, p.p. 1-63.
- [17] **M. Sadat Shojai, et al.**, (2013), *Synthesis Methods for Nanosized Hidroxyapatite with Diverse Structure*, *Acta Biomaterial*, 9(8), p.p. 7591-7621.
- [18] **Mondal, S., Dorozhkin, S. V., & Pal, U.** (2017). *Recent progress on fabrication and drug delivery applications of nanostructured hydroxyapatite*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, Vol. 10(4), p.p. 1-32.
- [19] **Silva, J.R.**, (2013), *Immunology in sea Urchins*, *Biology and Ecology* Lawrence, Chapter 3, p.p. 187-194.
- [20] **Andrew Cameron R., Jonathan P.**, (2014), *Genomic resources for study of sea urchin development*, *Methods in cell biology*, Chapter 30, Elsevier, p.p. 733-757.

- [21] **A. Tamilvanan, et al.**, (2014), *Copper Nanoparticles: Synthetic Strategies, Properties and Multifunctional Application*. International Journal of Nanoscience, Vol. 13, No. 2, p.p. 1431-14323.
- [22] **Noemi Jardón-Maximino, et al.**, (2018), *Oxidation of Copper Nanoparticles Protected with Different Coatings and Stored under Ambient Conditions*. Journal of Nanomaterials, Vol. 2018, p.p. 1-8.
- [23] **Zeev Zalevsky, Ibrahim Abdulhalim**, (2014), *Integrated Nanophotonic Devices*, Second Edition. Integrated Nanoplasmonic Logic Circuitry. William Andrew (Elsevier), p.p. 247-248.
- [24] **Ravi S. Hegde, Saumyakanti Khatua**, (2019), *Nanoelectronics*. Hot Carrier Generation in Plasmonic Nanostructures. Elsevier, p. 289.
- [25] **J.L. Richens, P. O'Shea, et al.**, (2014), *Biomedical Imaging. Next generation techniques for biomedical imaging*. Woodhead Publishing (Elsevier), p. p. 73-74.
- [26] **Raymon Chang & Kenneth A. Goldsby**, (2013), *Electroquímica*, Química 11va edición. Mc Graw Hill, p.p. 814-828.
- [27] **Gary D. Christian**, (2009), *Celdas electroquímicas y potenciales de electrodo*, Química Analítica sexta edición. Mc Graw Hill, p.p. 354-360.
- [28] **Jörg Polte, et al.**, (2015), *Fundamental Growth Principles of Colloidal Metal Nanoparticles a new Perspective*. Cryst.Eng.Comm, p.p. 1-21.
- [29] **Nguyen T. K. Thanh, et al.**, (2014), *Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution*. Chemical Reviews, p.p. 7610–7630.
- [30] **Subhra Jana, et al.**, (2015), *Advances in Nanoscale Alloys and Intermetallics: Low Temperature Solution Chemistry Synthesis and Application in Catalysis*. Royal Society of Chemistry, vol. 44, p.p. 18692–18717.
- [31] **German Urbina-Villalba, et al.**, (2014), *El Fenómeno de maduración de Ostwald. Predicciones de las simulaciones de estabilidad de emulsiones sobre la evolución del radio cúbico*

*promedio de una dispersión*, Revista del Centro de Estudios Interdisciplinarios de la Física, Vol. 3, p.p. 1-21.

[32] **Juan M. D. Tascón, et al.**, (2013), *La teoría de Ostwald-de Izaguirre sobre adsorción en disolución*. Parte 1. Génesis y presentación de la teoría, Real Sociedad Española de Química, Vol. 109, p.p. 193-200.

[33] **Vincent Gerbaud, et al.**, (2019), *Modelado de estados de agregación de Smoluchowski*, Enfoque probabilístico del equilibrio termodinámico, El sevier, cuarta edición, p.p. 2-8.

[34] **Jean-Louis**, (2014), *Teorías relativas a la estabilidad de coloides liofóbicos (DLVO y Von Smoluchovski)*, Laboratorio de formulación, interfases reología y procesos, p.p. 1-23.

[35] **Alba Rebeca Gutiérrez Meléndez**, (2016), *Relación entre los espectros UV-vis y el tamaño y morfología de nanopartículas*, tesis para obtener el grado de maestra en ciencias, p.p. 1-125.

[36] **C. F. Bohren, D. R. Huffman**, (2008), *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, Wiley, New York, p.p. 23-28.

[37] **Jing-Liang Li, M. G, et al.**, (2010), *Gold-Nanoparticle-Enhanced Cancer Photothermal Therapy*. IEEE Journal of selected topics in quantum electronics, vol. 16, p.p. 989–996.

[38] **Marie-Isabelle Baraton, et al.**, (2010), *Functionalization and Surface Treatment of Nanoparticles*. Univeristy of Limoges France, American Scientific Publishers, p.p. 541-553.

[39] **Wang, Z. L., et al.**, (2010), *Characterization of Nanophase Materials*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, p.p. 1123-1131.

[40] **Murphy, C. J., et al.**, (2016), *Chemistry of Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, p.p. 256-264.

[41] **Murphy, C. J., et al.**, (2010). *The many faces of gold nanorods*. *Journal of Physical Chemistry Letters*, Vol. 1(19), p.p. 2867–2875.

- [42] **Zhu, H., Zhang, C., y Yin, Y,** (2004), *Rapid synthesis of copper nanoparticles by sodium hypophosphite reduction in ethylene glycol under microwave irradiation*, Journal of Crystal Growth, Vol. 270, p.p. 722-728.
- [43] **Pivac, B., et al.,** (2018), *Self-Ordered Voids Formation in SiO<sub>2</sub> Matrix by Ge Outdiffusion*, Journal of Nanomaterials, p.p. 1–9.
- [44] **Li, D., McCann, J. T., Gratt, M., y Xia, Y,** (2004), *Photocatalytic deposition of gold nanoparticles on electrospun nanofibers of titanium*, Chemical Physics Letters, Vol. 394, p.p. 387-391.
- [45] **Rosaria D'Amato, Y., Lim, B., Skrabalak, S. E,** (2009), *Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: Simple chemistry meets complex physics?* Ange wand the Chemical International Edition, Vol. 48, p.p. 60–103.
- [46] **M. Sadat Shojai, et al.,** (2013), *Synthesis Methods for Nanosized Hidroxyapatite with Diverse Structure*, Acta Biomaterial, 9(8), p.p. 7591-7621
- [47] **Ghost, N., Saha, A,** (2017), *Hybrid Nanostructures*, Journal of Pharmacy and Pharmaceutics, Vol. 4, p.p. 1–3.
- [48] **Xie, R. C., y Shang, J. K,** (2007). *Morphological control in solvothermal synthesis of titanium oxide*, Journal of Materials Science, vol. 42, p.p. 6583-6591.
- [49] **Contreras, O., Rodriguez, C. E., et al.,** (2012), *Photo and radioluminescence characteristics of titanium nanoparticles by hidrotermal and pressureassisted combustion synthesis*. Optical Materials, Vol. 34, p.p. 1116–1119.
- [50] **Zanella, R., Delannoy, L., y Louis, C,** (2005), *Mechanism of deposition of gold precursors onto TiO<sub>2</sub> during preparation by deposition-precipitation with NaOH and with urea and by cation adsorption*, Applied Catalysis A, Vol. 291, p.p. 62-72.
- [51] **Perez-Tijerina, et al.,** (2009), *Luminescent nanoparticles and their applications in the life sciences*. Journal of physics. Condensed matter: an Institute of Physics journal, Vol. 25, p.p. 19-25.

- [52] **Pérez-Juste, J., Pastoriza-Santos, I., Liz-Marzán, L. M., y Mulvaney, P.** (2005), *Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications*. Coordination Chemistry Reviews, Vol. 249, p.p. 1870-1901.
- [53] **Cheng M., Yoshimura, M.** (2009), *Synthesis and characteristics of complex multicomponent oxides prepared by polymer complex method*, Bulletin of the Chemical Society of Japan, Vol. 72, p.p. 8-16.
- [54] **Holst C., et al.**, (2005), *Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of a sulforodamida B in analogue on human breast cancer cell lines*, Toxicology in Vitro, Vol. 19, p.p. 379-387.
- [55] **Behnajady H., Shahtahmasebi**, (2013), *Gradual growth of gold nanoseeds on silica for SiO<sub>2</sub>@gold homogeneous nano core/shell applications by the chemical reduction method*, Physica Scripta, Vol. 87, p.p. 2–7.
- [56] **Collier, C. P., et al.**, (2007), *Reversible tuning of silver quantum dot monolayers through the metal-insulator transition*, Science materials, Vol. 277, p.p. 1978-1981.
- [57] **Kurihara G., Marrazza, G.** (2015), *Gold and Magnetic Nanoparticles-Based Electrochemical Biosensors for Cancer Biomarker Determination*, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, Vol. 15, p.p. 3307–3319.
- [58] **Ajay Vasudeo Rane, et al.**, (2018), *Synthesis of Inorganic Nanomaterials. Methods for Synthesis of Nanoparticles and Fabrication of Nanocomposites*. Woodhead Publishing, p.p. 121-139.
- [59] **Mifsud Grau, M.** (2008). *Empleo de catalizadores heterogéneos para la obtención de productos de alto valor añadido: fármacos, aromas y surfactantes*. Universidad politécnica de Madrid.
- [60] **Anastas, P., & Eghbali, N.** (2010). *Green chemistry: principles and practice*. Chemical Society Reviews, Vol. 39(1), p.p. 301-312.

- [61] **Josefina Plaza, et al.**, (2012), *Biosorption of chromium (III) by two Brown algae *Macrocystis pyrifera* and *Undaria pinnatifida*: study of balance and kinetics*. Wiley Science, Vol. 12, p.p. 95-103.
- [62] **Sanjay K. Motwani, et al.**, (2008), *Chitosan-Sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: formulation, optimisation and in vitro characterization*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Vol. 68, p.p. 513-525.
- [63] **Juan M. Martinez-Andrade et al.**, (2017), *Dual function of EDTA with silver nanoparticles for root canal treatment: A novel modification*. PLOS ONE, vol. 5, p.p. 1-19.
- [64] **Belen Borrego, et al.**, (2016), *Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of rift valley fever virus in vitro and in vivo*. Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine, Vol. 12, No. 5, p.p. 1185-1192.
- [65] **Dagmar Chudobova, et al.**, (2015), *Nanotechnology in Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of Infectious Diseases. Complexes of Metal-Based Nanoparticles with Chitosan Suppressing the Risk of Staphylococcus aureus and Escherichia coli Infections*. ACADEMIC PRESS, p.p. 217-222.
- [66] **Ahmed Abdal Dayem, et al.**, (2017), *The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles*. International Journal of Molecular Science, Vol. 120, p.p. 1-21.
- [67] **Paul Held, et al.**, (2015), *An Introduction to Reactive Oxygen Species-Measurement of ROS in Cells*. BioTek, p.p. 1-21.
- [68] **Ricardo Hugo Lira Saldivar, et al.**, (2016), *Potencial de la nanotecnología en la agricultura*, Acta Universitaria de Nanotecnología, Vol. 6, p.p. 487-505.
- [69] **B. León, et al.**, (2009), *Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants*, Springer Science+Business Media, LLC, p.p. 26.

- [70] **Z. Sheikh, S. Najeeb, Z. Khurshid**, (2015), Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications, *Materials*. MDPI AG., p.p. 5744-5794.
- [71] **Madeeha Riaz, et al.**, (2018), Synthesis of monophasic Ag doped hydroxyapatite and evaluation of antibacterial activity, *Materials Science & Engineering*, Vol. 9, p.p. 308-313.
- [72] **Teodóra Nagyné-Kovács, et al.**, (2018), Synthesis and characterization of Sr and Mg-doped hydroxyapatite by a simple precipitation method, *Ceramics International*, Vol. 44, p.p. 22976-22982.
- [73] **Global Biotech Consulting Group, (SA)**, *La Industria Pesquera en México*, Recuperado de: [http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/pesca\\_en\\_mexico.html](http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/pesca_en_mexico.html)
- [74] **Instituto Mexicano del Seguro Social**, (2015), *Diagnóstico y tratamiento de las Diagnóstico y tratamiento de las Diagnóstico y tratamiento de las Infecciones Asociadas a Dispositivos Ortopédicos, Prótesis y/o material de osteosíntesis*, Guía de practica clínica, p.p. 7-64.
- [75] **Jaime Renau-Piqueras, Magdalena Faura**, (2002), *Principios básicos del Microscopio Electrónico, Sección de Microscopía Electrónica*, Centro de Investigación Hospital "La Fé", p.p. 1-20
- [76] **A. Naik**, (1975), *Fundamentos del microscopio electrónico y su aplicación en la investigación textil*. Instituto de Investigación Textil y Cooperación Industrial, No. 64, p.p. 39-50.
- [77] **Jonas Neumeier**, (2015), *Photophysics of Graphene Quantum Dots*, p.p. 1-44.
- [78] **N. Pineda Aguilar**, (2017), *Microscopia Electrónica de Barrido*, Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C, Recuperado de: <http://mty.cimav.edu.mx/sem/>
- [79] **Joseph I. Goldstein, et al.**, (2017), *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis, Trace Analysis by SEM/EDS*. Springer, pp 341-357.

- [80] **A. Fernández**, (2012), *Últimos avances en microscopía electrónica de transmisión y su contribución al estudio de los nanomateriales*, Universidad de Sevilla (Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla), p.p. 1-39.
- [81] **Wang, Z. M., Wagner, J., Ghosal, S., Bedi, G., & Wall, S.** (2017). *SEM/EDS and optical microscopy analyses of microplastics in ocean trawl and fish guts*. *Science of the Total Environment*, Vol. 60, p.p. 616-626.
- [82] **Girao, A. V., Caputo, G., & Ferro, M. C.** (2017). *Application of scanning electron microscopy–energy dispersive X-ray spectroscopy*. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 75, 153-168.
- [83] **ThermoScientific**, (2019), *Espectroscopía de Fotoelectrones de rayos X, análisis de superficies y películas delgadas*, recuperado de: <https://xpssimplified.com/whatisxps.php>
- [84] **L'H.Yahia, L.K.Mireles**, (2017), *Characterization of Polymeric Biomaterials, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF SIMS)*. WOODHEAD PUBLISHING, p.p. 83-97.
- [85] **Teresa M. Piqué, Analía Vázquez**, (2012), *Uso de Espectroscopía Infrarroja Con Transformada De Fourier (FTIR) en el Estudio de la Hidratación del Cemento*. *Concentro y Cemento, Investigación y Desarrollo*, Vol. 3, p.p. 62-71.
- [86] **Raúl Gómez y Rogelio Murillo**, *Espectroscopía Infrarroja*, p.p. 1-14. Recuperado de <http://sistemas.fciencias.unam.mx/~fam/Infrarroja.pdf> .
- [87] **Dipesh Kumar, et al.**, (2015), *Algae and Environmental Sustainability, Developments in Applied Phycology, Bio-oil and biodiesel as biofuels derived from microalgal oil and their characterization by using instrumental techniques*. Springer, p.p. 87-96.
- [88] **Fernando Millan**, (2016), *Métodos Espectroscópicos UV Visible para análisis molecular y elemental*, Ingeniería Química y Agronomía, P.P. 1131.

- [89] **Maria Luisa Castro de Esparza, Martha I. Litter, Maria Wong, Vilma Mori**, (2009), *Metodologías analíticas para la Determinación y Especificación de As en Aguas y Suelos, Métodos Espectrofotométricos UV-Vis*. CYTED, p.p. 43-62.
- [90] **Neelakshi Gohain**, (2009), *Studies on the structure and function of phenazine modifying enzymes PhzM and PhzS involved in the biosynthesis of pyocyanin*. p.p. 1-133.
- [91] **David L. Nelson**, (2015), *Principios de bioquímica*, Sexta edición, Ed. OMEGA, p.p. 254.
- [92] **A. K. Chatterjee**, (2001), *Learn more about X-Ray Diffraction*, Handbook of Analytical Techniques in Concrete Science and Technology, p.p. 275-332.
- [93] **Chauhan, A., & Chauhan, P.** (2014). *Powder XRD technique and its applications in science and technology*. Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques, Vol. 5, p.p. 78-83.
- [94] **Polizzi, S., Fagherazzi, G., Benedetti, A., Battagliarin, M., & Asano, T.** (1991). *Crystallinity of polymers by X-ray diffraction: A new fitting approach*. European Polymer Journal, Vol. 27, p.p. 85-87.
- [95] **Bunaciu, A. A., UdrișTioiu, E. G., & Aboul-Enein, H. Y.** (2015). *X-ray diffraction: instrumentation and applications*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, Vol. 45, p.p. 289-299.
- [96] **E. Mancilla-Sanchez, CM. Gómez-Gutiérrez, G. Guerra-Rivas, PA Luque, et al.**, (2018), *Obtaining hydroxyapatite from the exoskeleton and spines of the purple sea urchin Strongylocentrotus purpuratus*. Int J Appl Ceram Technol, p.p. 1-6.
- [97] **NA. Thamer, et al.**, (2018), *Optimization proprieties and characterization of Green synthesis of Copper oxide nanoparticles using aqueous extract of Cordia myxa leaves*, Asian journal Chemistry, p.p. 1559-1563
- [98] **H. Raja Naika, et al.**, (2016), *Green synthesis of CuO nanoparticles using Gloriosa superba L. extract and their antibacterial activity*, Journal Taibah University for Science, Vol. 9, p.p. 7-12.

- [99] **Renata Reisfeld, et al.**, (2016), *Intensification of luminescence of Europium-EDTA complex in polyvinyl pyrrolidone films by copper nanoparticles*, *Optical Materials*, Vol. 59., p.p. 3-7.
- [100] **Xia, Y., Xiong, Y., Lim, B., Skrabalak, S. E.** (2009). *Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: Simple chemistry meets complex physics?* *Angewandte Chemie - International Edition*, 48(1), 60–103. doi:10.1002/anie.200802248
- [101] **Maidaniuc, A., Miculescu, et al.**, (2017). *Induced wettability and surface-volume correlation of composition for bovine bone derived hydroxyapatite particles*. *Applied Surface Science*. Vol. 438, p.p. 158-166.
- [102] **Madeeha Riaza, et al.**, (2018), *Synthesis of monophasic Ag doped hydroxyapatite and evaluation of antibacterial activity*, *Materials Science & Engineering C*, Vol. 90, p.p. 308-313.
- [103] **Maidaniuc, A., Miculescu, F., et al.**, (2017). *Induced wettability and surface-volume correlation of composition for bovine bone derived hydroxyapatite particles*. *Applied Surface Science*. Vol. 438, p.p. 158-166.
- [104] **Yuxiao Zhang, et al.**, (2018), *Preparation and characterization of hydroxyapatite nanoparticles carrying insulin and gallic acid for oral delivery*, *Biology and medicine*, Vol. 14, p.p. 353-364.
- [105] **Mendez-Lozano, et al.**, (2017), *Crystal growth and structural analysis of hydroxyapatite nanofibers synthesized by the hydrothermal method*, *Ceramics international*, Vol. 43, p.p. 451-457.
- [106] **Teodóra Nagyné-Kovácsa, et al.**, (2018), *Synthesis and characterization of Sr and Mg-doped hydroxyapatite by a simple precipitation method*, *Ceramics International*, vol. 44, p.p. 22976-22982.