

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD



**SÍNTESIS DE UN BIONANOMATERIAL DE HIDROXIAPATITA
CON PLATA Y FLÚOR Y EVALUACIÓN DE SU
BIOCOMPATIBILIDAD**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA

VERÓNICA GONZÁLEZ TORRES

PRESIDENTE

DR. GERARDO CÉSAR DÍAZ TRUJILLO

SINODALES:

DR. MIGUEL ÁNGEL CADENA ALCÁNTAR

DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

DRA. MARÍA ELEUTERIA TORRES ARELLANO

DR. LUIS ALBERTO GAITÁN CEPEDA

TIJUANA, BAJA CALIFORNIA, SEPTIEMBRE 2014

DEDICATORIA

A Humberto, Carolina y Daniel Humberto

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme concluir este proyecto.

A Humberto, por su amor, apoyo y comprensión.

A mis hijos, Carolina y Daniel, por haberme permitido robarles un poco de su tiempo para que pudiera hacer todo lo que este proyecto implicó, por comprender que mamá tenía tarea que hacer y que en ocasiones se tenía que ausentar.

A mis padres, por su amor, por su entusiasmo y apoyo cada vez que inicio un proyecto, pero sobre todo por ser ejemplo de superación y constancia a nivel personal y profesional.

Al Dr. César Díaz Trujillo por haber aceptado guiarme en este proyecto, por su entusiasmo, por su tiempo, por compartirme sus conocimientos y experiencias, por su apoyo incondicional y paciencia, por confiar en mí, por permitirme formar parte de su equipo, pero sobre todo por haberme introducido al mundo de la investigación desde que fui su alumna en la licenciatura.

Al Dr. Miguel Ángel Cadena Alcántar y a la Dra. Ana Gabriela Carrillo Vázquez, por haberme permitido ingresar al programa, por la confianza depositada en mi persona y por su apoyo para la realización de este proyecto.

Al Dr. Luis Alberto Gaitán Cepeda, por compartir su experiencia y conocimientos, por su paciencia, por enseñarme a ver que los resultados son simplemente resultados, no son buenos ni malos, y por haberme apoyado en la realización de los ensayos de biocompatibilidad, sin su ayuda creo que hubiera sido complicado analizar e interpretar esos resultados.

A la Dra. Cristina Piña, por sus palabras de aliento y sincero interés en este proyecto; a sus colaboradores, M.C. Adriana Tejeda, Ing. Carlos Flores y Dr. Omar Novelo, por apoyarme en la caracterización fisicoquímica de los materiales.

Al Dr. Horacio Almanza y a la Dra. Raquel Vega por su apoyo en la colocación de los materiales para la evaluación de biocompatibilidad. Al Dr. Edgar Méndez por su valioso tiempo y apoyo en la preparación de las muestras histológicas, en la obtención de imágenes y en la interpretación de resultados de los ensayos de biocompatibilidad. Al Dr. Enrique Schultz por su apoyo en la interpretación de imágenes.

A la Facultad de Odontología Tijuana, a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, a la Facultad de Medicina y Psicología, al Centro de Ciencias de la Salud, Unidad Valle de las Palmas, de la Universidad Autónoma de Baja California; al Instituto de Investigación en Materiales de la Universidad Nacional Autónoma de México; y al Departamento de Investigación en Física de la Universidad de Sonora, porque en sus espacios se desarrollaron actividades para las distintas fases de este proyecto.

A mis compañeros de posgrado por aceptarme en su grupo, por su amistad, por las experiencias compartidas y por las risas que relajaban el estrés.

A mis hermanas, a todos aquellos que me animaron a continuar y también a aquellos que no dudaron que lo lograría.

Gracias.

RESUMEN

Los bionanomateriales son materiales, naturales o sintéticos, que interaccionan con sistemas biológicos para cualquier propósito de diagnóstico o biomédico; contienen en su estructura al menos una dimensión menor a 100 nm y como característica principal deben ser biocompatibles, es decir, deben ser capaces de co-existir en contacto con tejido humano sin causar un daño inaceptable al mismo. La hidroxiapatita es un compuesto inorgánico de fosfato de calcio cristalino que se encuentra presente en la fase mineral de tejidos calcificados, incluyendo los dientes. Por muchos años se le ha considerado un biomaterial útil en la ingeniería de tejidos para la sustitución ósea, como recubrimiento de metales, y para la dosificación de fármacos, entre otros usos. Este mineral tiene la capacidad de intercambiar iones con su medio circundante por lo que juega un papel importante en el proceso de desmineralización y remineralización del esmalte dental. Cuando la remineralización no se favorece, entonces se puede presentar una lesión cariosa. Considerando que el mecanismo de remineralización se puede estimular con soluciones mineralizantes artificiales, se pensó en elaborar biomateriales para tal fin. La plata por su parte se ha utilizado como agente antibacterial en distintas aplicaciones por lo que añadirlo a la estructura de la hidroxiapatita podría conferirle características especiales.

El objetivo de este proyecto fue el de sinterizar una serie de biomateriales nanoestructurados a base de hidroxiapatita con inclusión de plata y flúor. El método utilizado para la sinterización de los biomateriales fue el de combustión y se utilizaron diversas técnicas de microscopía electrónica, de espectroscopía y de rayos X para su caracterización fisicoquímica. Además se evaluó su biocompatibilidad mediante estudios *in vivo* implantando los materiales en roedores y evaluando su respuesta inflamatoria a 7, 14, 30 y 90 días. Los resultados muestran que fue posible obtener sistemas con hidroxiapatita, fluoroapatita y fosfatos de calcio con plata en su estado iónico en su estructura, con tamaños de partícula en la escala nanométrica. En cuanto a

su biocompatibilidad se encontró que los materiales de hidroxiapatita e hidroxiapatita con flúor fueron mejor tolerados en los diferentes tiempos de estudio, en comparación con el material de hidroxiapatita con plata y flúor ya que éste presentó respuestas inflamatorias diversas entre los 7 y 30 días, sin embargo después de los 90 días se observó una mejoría en la respuesta inflamatoria.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.2 Marco teórico	4
1.3 Problema.....	24
1.3.1 Pregunta	24
2. Justificación.....	24
3. Objetivos	25
3.1. Objetivo general.....	25
3.2. Objetivos particulares.....	25
4. Hipótesis	26
5. Materiales y métodos	26
5.1 Tipo de estudio	26
5.2 Universo de estudio	26
5.3 Criterios.....	26
5.3.1 Inclusión.....	26
5.4 Operacionalización de variables	27
5.5 Métodos	27
Fase I: Formulación y síntesis	28
Fase II: Caracterización microestructural de las formulaciones	31
Fase III: Ensayos de biocompatibilidad.....	51
6. Resultados.....	55
6.1 Discusión de resultados	89
7. Conclusiones	96
8. Bibliografía.....	97

1. INTRODUCCIÓN

La caries dental sigue siendo una de las enfermedades bucales más frecuentes dentro de la salud pública a nivel mundial. Se sabe que es una enfermedad infectocontagiosa, crónica que destruye los tejidos del órgano dentario, pudiendo llegar a ocasionar la pérdida del mismo. Esta enfermedad inicia su desarrollo como una lesión incipiente o mancha blanca que surge del resultado de desmineralización y remineralización del esmalte, en la que predomina la desmineralización producida por los ácidos que se generan en la cavidad bucal, por efecto de carbohidratos simples, que contienen los alimentos, sumándose además la actividad de los microorganismo que se encuentran en el biofilm.

Muchas son las sustancias que se utilizan para la remineralización del esmalte, ya sea en forma natural como es el flujo y la capacidad buffer de la saliva; así como por medios externos o coadyuvantes como lo son el uso de los fluoruos, clorhexidina, y xilitol, entre otros.

Actualmente han surgido los nanomateriales de hidroxiapatita para favorecer el proceso remineralizante del esmalte, como es el nanoXIM.CarePaste para usar en pastas dentales y enjuagues bucales, este producto tiene el potencial de restaurar el esmalte dental, reducir la sensibilidad dental, así como favorecer el blanqueamiento y brillo dental. Otro producto es el desensibilize NanoP, que es una pasta desensibilizante y remineralizante, basada en fosfato de calcio nanométrico (en forma de hidroxiapatita), fluoruro de sodio y nitrato de potasio; es biocompatible y aplicable en el tratamiento de lesiones cariosas incipientes (mancha blanca), en el control de la erosión dental y en el tratamiento de la hipersensibilidad originada por exposición radicular.

En el presente trabajo, se pretende llevar a cabo la sinterización de hidroxiapatita con la inclusión de flúor y/o plata, mediante la técnica de combustión seguida de tratamiento térmico adicional a fin de considerar un producto que pueda ubicarse con función remineralizadora y antimicrobiana por su acción oligodinámica sobre los microorganismos.

1.1 ANTECEDENTES

En Washington en el 2008 José Carlos Brito Lopes y col. (1), crearon un método para la producción de fosfato de calcio nanoparticulado con alta pureza, para aplicarlo como aditivo de alimentos, suplementos nutricionales, reemplazos óseos, así como para favorecer el crecimiento y la reparación de los mismos; en biocementos y como recubrimientos de implantes metálicos. También lo usaron en cosméticos, pastas dentales y tratamientos estéticos.

En Portugal, Pablo J Gómez y col. (2) realizaron un estudio de un proceso continuo altamente reproducible para la síntesis de nano partículas de hidroxiapatita (nanoXIM) a base de soluciones de calcio, soluciones de fósforo y soluciones alcalinas, utilizando un reactor que permite el control del micromezclado que es esencial para la formación de estructuras nanométricas así como también un factor determinante en la pureza de los cristales, cristalinidad y morfología de los mismos. El esquema de la distribución de los reactantes es así mismo un factor crucial para programar las propiedades del medio tales como el pH, el grado de saturación, la relación molar de Ca-P y la temperatura. Las nanopartículas de fosfato de calcio que salen del sistema se someten a un proceso de envejecimiento, separación, secado, sinterizado y molienda. Estos autores consideran a la hidroxiapatita como un biomaterial utilizado como aditivos de alimentos, suplementos nutricionales; sustituto óseo, biocemento y en recubrimientos de implantes dentales.

En otro estudio realizado en Gaithersburg, Md, US en 2006 por Limin Sun y Col.(3), mencionan que el fosfato de calcio nanoestructurado (nano -CaF₂) puede usarse como un efectivo agente anticaries, incrementando la disponibilidad de la concentración de flúor en fluido oral y de esta manera incrementar la remineralización del diente.

En Brasil, la compañía FGM productos odontológicos, desarrolló una tecnología innovadora basada en fosfatos de calcio nanoestructurados (tecnología Nano P), biocompatibles, que

cuando se incorporan a los materiales odontológicos, potencializan su acción y contribuyen para la introducción de nuevas perspectivas en odontología y diversas especialidades.

El Desensibilize NanoP, presenta características químicas y estructurales semejantes a las de la hidroxiapatita natural. Cuando son comparados a los fosfatos de calcio convencionales (en la micro o macro escala), los nanofosfatos de calcio presentan una mayor bioactividad, pues el pequeño diámetro de sus partículas y su morfología aumentan su área superficial, su capacidad de hidratación, humedad y solubilidad, permitiendo que éstos liberen iones calcio y fosfato al medio bucal, en las concentraciones y velocidades adecuadas. Estas cualidades en conjunto potencializan la respuesta biológica del Desensibilize NanoP y posibilitan que se restaure la microestructura, la composición química y funcionalidad de la estructura dental.

La hidroxiapatita actúa de forma compatible en la obliteración de la dentina expuesta y de las microfisuras del esmalte y de igual forma en la remineralización del órgano dentario asociada a su capacidad de proveer iones de calcio, fosfato y fluoruro a la superficie desmineralizada, los cuales pueden reorganizarse sobre la superficie dental en la forma de hidroxiapatita, fluorapatita o fluoruro de calcio, con resistencia ácida semejante al diente natural. Por ser esta hidroxiapatita una forma cristalina y organizada de fosfato de calcio y con baja solubilidad en pH neutro, después de su aplicación en la superficie dental, es capaz de integrarse fácilmente a este tejido, que también es compuesto por hidroxiapatita, reparando sus deficiencias y mimetizándolo funcionalmente por actuar como un sistema de liberación de iones calcio y fosfato, esencial para la manutención de balance mineral del diente en las condiciones de desafío ácido (bajo pH), que son críticas para la formación cariosa y erosión.

En un estudio realizado en 2006 por Li Li y Col. (4) se menciona que la hidroxiapatita puede utilizarse en la remineralización del esmalte dental si se logra obtener el mineral con un tamaño de partícula similar al que está presente en el esmalte, es decir, de forma nanoparticulada con un tamaño de partícula entre 20 y 40 nanómetros (nm).

1.2 MARCO TEÓRICO

La hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, es un compuesto inorgánico de fosfato de calcio cristalino con una estructura tipo hexagonal de gran importancia biológica pues se encuentra presente en la fase mineral de tejidos calcificados, tanto en huesos (5) como en dientes (dentina y esmalte) (6, 7), su función primaria es proveer rigidez estructural a la matriz de estos tejidos. En la figura 1 se muestra la estructura cristalina de la hidroxiapatita.

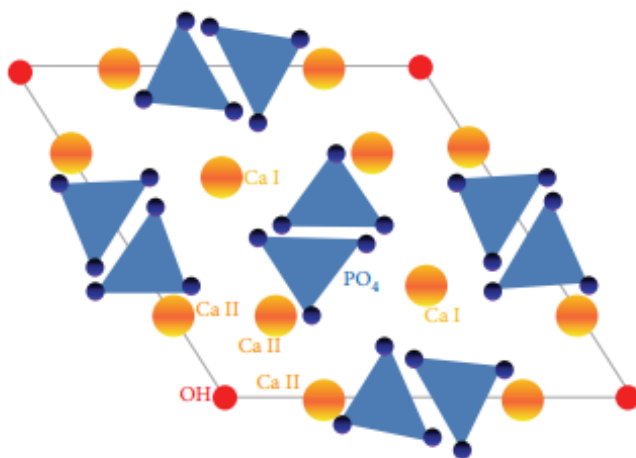


Figura 1. Modelo de cristal hexagonal de hidroxiapatita

Las características estructurales importantes de la hidroxiapatita estequiométrica son sus grupos hidroxilo estructurales, arreglados hacia los bordes de las celdas elementales, formando columnas $-\text{OH}-\text{OH}-\text{OH}-$. Los átomos de oxígeno de estos grupos están espaciados de tal forma que no pueden formar puentes de hidrógeno (8). Incluye dos tipos de iones calcio, conocidos como Ca (I) y Ca (II). Los átomos de calcio Ca (I) se localizan en los bordes de la celda unitaria hexagonal, mientras que los átomos de calcio Ca (II) forman triángulos equiláteros con la columna de grupos OH en el centro de la estructura (9, 10). Los iones fosfato son los iones más largos que conforman la celda unitaria y son los que determinan la forma de la estructura (10). La relación Ca:P de la hidroxiapatita pura es 1.67, sin embargo la relación del

mineral presente en huesos puede variar de 1.37 a 1.87 debido a la combinación de fosfatos de calcio que puede presentar (11).

Una de las características primarias de la hidroxiapatita es su capacidad para sustituir iones. Esto significa que las ubicaciones de los grupos OH^{-1} pueden ser ocupadas por iones de tamaño y carga similar como Cl^{-1} , F^{-1} y CO_3^{2-} (11). Las ubicaciones para los iones fosfatos pueden ser ocupadas por BO_3^{3-} , y los iones calcio pueden ser intercambiados por iones Mg^{2+} , Mn^{2+} , o Sr^{2+} . En algunos casos, se puede tener un intercambio total o parcial. Es total cuando se intercambian iones OH-F o Ca-Sr. Un aspecto importante es la posibilidad de poder sustituir iones con diferentes cargas. Por ejemplo, es posible intercambiar iones fosfato (-3) con iones carbonato (-2). Tal situación crea una vacante cargada positivamente, que se compensa por la liberación simultánea de un ion calcio y uno de OH (10).

Forma parte de una familia de minerales bastante estables químicamente (muy poco soluble en agua) a pH neutro (6) y básico (11), razón por la que la mayor parte del calcio en el organismo está presente en estado sólido, almacenado principalmente en el tejido óseo (12). Puede resistir la descomposición térmica a temperaturas superiores a los 1000°C, esto permite que los tratamientos de sinterizado puedan modificar su cristalinidad y porosidad (11). Sin embargo, a pH ácidos puede presentar solubilidad liberando iones de calcio o fosfato en la solución, tal es el caso de la saliva, en la que esta situación puede producir la pérdida de estos iones en la capa de esmalte (formado por hidroxiapatita) que recubre al órgano dentario lo que puede originar la presencia de caries.

La caries se considera como una enfermedad infecto-contagiosa, crónica, que destruye los tejidos de los órganos dentarios de forma irreversible, y es provocada por la acción de los ácidos producidos por los microorganismos que integran la placa dental (13, 14). Esta lesión inicia su desarrollo como una lesión incipiente o mancha blanca, que surge como resultado de la desmineralización y remineralización (DES/RE) del esmalte, lo que le confiere un entorno

dinámico, que se caracteriza por la constante pérdida y captación de minerales (15). Este binomio debe de conservarse en equilibrio, ya que si se interrumpe y es a favor de la desmineralización ya sea por la acumulación de placa, ingesta frecuente de hidratos de carbono simples (alimentos o bebidas), o por la falla de mecanismos de defensa como lo es la disminución del flujo salival o del pH, o de su capacidad buffer; se produce pérdida de estructura en el esmalte la que se observa como un área blanquecina llamada mancha blanca o lesión cariosa incipiente (16) siendo más extensa que profunda. En esta etapa la lesión puede ser reversible por remineralización o bien puede llegar a cavidad si no es tratada, lo que conlleva a la pérdida prematura del órgano dentario lesionado.

La remineralización es un proceso de precipitar calcio, fosfato y otros iones en la superficie o dentro del esmalte parcialmente desmineralizado (15). Una lesión puede remineralizarse dependiendo del número de los factores incluidos en la dieta, el uso de fluoruros y la acción buffer de la saliva. Si una capa delgada de esmalte está todavía intacta, la lesión incipiente puede remineralizarse; si está desorganizada se interrumpe el proceso de remineralización. Si esta lesión cariosa incipiente continúa su desmineralización, ésta puede penetrar a la dentina creando una cavidad que es irreversible por naturaleza.

ESMALTE

El esmalte es el tejido humano más mineralizado y más duro, su composición alcanza el 96% de material inorgánico, 1% de orgánico y 3% de agua (17, 18). La porción inorgánica está compuesta de cristales de hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, los cuales determinan una composición molecular y una estructura espacial que le permite efectuar importantes reacciones fisicoquímicas con el medio salival (17). Los cristales de este mineral son largos (posiblemente mayores a 1mm), con 50 nm de ancho y con un grosor de 25 nm, se extienden desde la dentina hacia la superficie del esmalte, formando prismas (14). Esta hidroxiapatita

presenta iones de flúor que le proporcionan mayor resistencia a la abrasión (19) y también iones de carbonato, sodio y magnesio (14). Reacciona exclusivamente con pérdida de sustancia frente a todo estímulo, sea físico, químico o biológico (18), aumentando su porosidad, lo que permite el paso en ambas direcciones de ácidos, minerales, fluoruros y otras sustancias.

La saliva juega un papel importante, normalmente su pH es de 6.2 a 6.8, en estas condiciones las estructuras cristalinas se conservan como tales, cuando el pH disminuye por acción de los ácidos hasta un nivel de 5.5 (pH crítico de la hidroxiapatita adamantia) los cristales se disocian y tienden a difundirse hacia el medio externo, produciendo la desmineralización. Esto no ocurre de manera constante, ya que la acción buffer de la saliva (pH salival) lo vuelve a estabilizar, incorporando nuevos cristales a la superficie dentaria, dando como resultado el proceso inverso la remineralización, la cual se produce en aproximadamente 20 minutos (6). Este proceso ocurre de manera continua en casi todas las superficies proximales, mientras que haya iones de fosfato y calcio disponibles en la saliva, que además también contiene bajas concentraciones de iones de fluoruros que aceleren la remineralización. Por lo general estas manchas blancas o caries incipientes son reversibles por lo que no requieren un tratamiento invasivo (20).

La remineralización tiene lugar sobre y dentro de la superficie expuesta al ambiente bucal. Esta capa contiene cristales reformados en una matriz, que deriva de la saliva, de los alimentos y de productos bacterianos. Los cristales son principalmente de apatita, pero más grandes que los que se encuentran en la dentina sana con una proporción alta de calcio y fósforo (Ca:P) y elevado contenido de flúor (F). También pueden encontrarse algunos fosfatos de calcio que no son apatita. Esto sugiere la posibilidad de estimular el endurecimiento con soluciones mineralizantes artificiales razón por la que se pretende sintetizar y utilizar bionanomateriales ricos en hidroxiapatita para favorecer este proceso y prevenir la lesión cariosa (21).

BIOMATERIALES

El término biomateriales define a todos aquellos materiales, ya sea naturales o sintéticos, que interaccionan con sistemas biológicos para cualquier propósito de diagnóstico o biomédico (22), sin embargo en la Universidad de Cambridge, Serena Best, investigadora del Departamento de ciencias de los materiales y metalurgia menciona que los biomateriales son aquellos que se sintetizan a nivel laboratorio y son compatibles con los sistemas biológicos; se caracterizan de acuerdo a la respuesta que ofrecen cuando entran en contacto con éstos, clasificándose en materiales bioinertes o bioactivos, pudiendo ser reabsorbibles o no reabsorbibles. En cuanto a su estructura pueden ser materiales policristalinos, vidrios, vitrocerámicos y resinas bioactivas, en forma de bloque poroso o bloque denso, gránulos, recubrimientos y recientemente en forma de nanomateriales. Los materiales cerámicos típicamente se obtienen a partir de la aplicación de calor a precursores sólidos inorgánicos de naturaleza no metálica, como óxidos inorgánicos, sales inorgánicas.

Los materiales nano estructurados conocidos también como nanomateriales son aquellos que en su estructura tienen componentes con al menos una dimensión menor a 100 nm (23). Se pueden dividir de acuerdo al contenido dimensional en nano escala, por ejemplo, entre los materiales que contienen una dimensión en la nano escala están las capas tales como recubrimientos de superficies muy delgados; cuando contienen dos dimensiones en nano escala se habla de nano tubos o nano alambres; entre los materiales que contienen tres dimensiones en nano escala se encuentran las partículas como precipitados, coloides, y polvos. Los nanomateriales tienen propiedades químicas, físicas, mecánicas y ópticas únicas (23), en comparación con estructuras micro o macroscópicas, por lo que su aplicación es muy basta. En la figura 2 se muestra una imagen en donde se puede apreciar la escala de diferentes materiales.

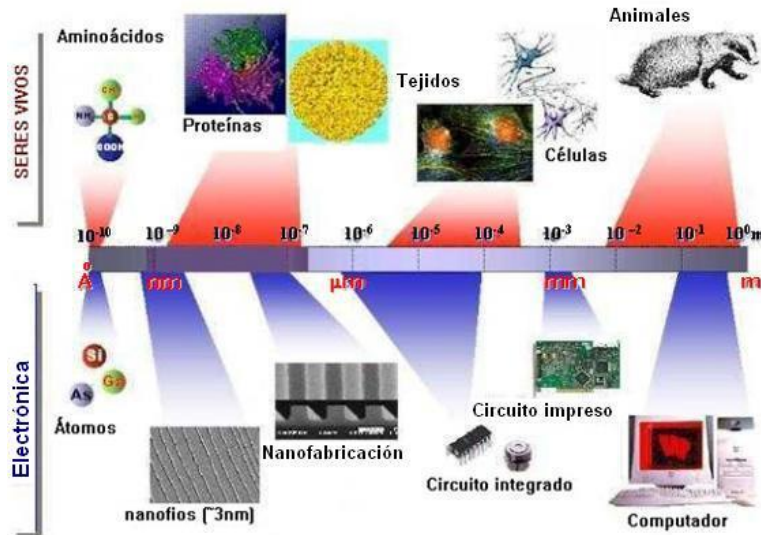


Figura 2. Escala de diferentes materiales.

Fuente: <http://www2.udec.cl/~jorgzamb/PSI/nano.html>

Actualmente existe un amplio enfoque para el desarrollo de nanobiomateriales con aplicación biomédica, encontrándose por ejemplo, las bioinertes para aplicaciones dentales y bioimagen, y las cerámicas degradables y bioactivas utilizadas en la ingeniería de tejidos y para la producción de estructuras novedosas y resinas. Los bionanomateriales cerámicos incluyen dentro de su composición alumina, zirconia, fosfatos de calcio, que les confieren alta resistencia, estabilidad química, baja densidad y biocompatibilidad (24). Para aplicaciones dentales los biomateriales incluyen en su composición además leucita, leucita-apatita, disilicato de litio, fluoruro de calcio, dióxido de titanio e hidroxiapatita entre otros. Existen antecedentes de uso de la hidroxiapatita nanocrystalina aplicada como recubrimiento para mejorar la biocompatibilidad de titanio, en forma de pastas inyectables para sustitución ósea con buenas propiedades osteoconductoras y como anticuerpos la dosificación de fármacos en casos de infecciones óseas (22).

Se cuenta con diferentes métodos de obtención de biomateriales nanoparticulados, entre ellos, la abrasión por láser, síntesis de plasma, deposición por vapores químicos, aleaciones

mecánicas (molido de alta energía) sol-gel y combustión (23). Esta última presenta ventajas de practicidad para la sinterización de biomateriales de hidroxiapatita con escala nanométrica.

La ventaja de los nanomateriales sobre los materiales comunes es el incremento en el área de superficie relativa y los efectos cuánticos que pueden cambiar o mejorar propiedades. Conforme el tamaño de la partícula decrece, incrementa la proporción de átomos en la superficie en comparación con los que están dentro de la partícula, en consecuencia las nano partículas tienen mayor área de superficie por unidad de masa comparadas con partículas más grandes, esto implica que una cantidad dada de masa de material en forma de nano partícula va a ser más reactiva que la misma cantidad de masa en un material elaborado con partículas mayores, se podría decir que están más concentradas.

Debido a las características mencionadas con anterioridad, actualmente los polvos, resinas y selladores elaborados en forma nanoestructurada, se encuentran en proceso de estudio para el desarrollo de materiales con aplicaciones dentales. Las resinas cerámicas-poliméricas son materiales muy utilizados en los rellenos dentales. Otro ejemplo de nanomateriales utilizados como materiales dentales son las cerámicas con itrio estabilizado con óxido de circonio, que es utilizado para la fabricación de coronas, puentes, y otros elementos dentales debido a su dureza, durabilidad y apariencia estética (25). Se ha estudiado también la ventaja de la utilización de fluoruro de calcio en forma de nano partícula como un agente anti caries efectivo por el incremento en la concentración lábil de flúor en el fluido oral que en consecuencia incrementa la remineralización del diente (3). De igual forma se ha estudiado la incorporación de nano partículas de dióxido de titanio con organosilanos (aliltrietoxisilano) para mejorar las propiedades mecánicas de las resinas dentales y también se ha estudiado la preparación de biomateriales con hidroxiapatita como fuente de fosfato calcio para el recubrimiento de implantes dentales metálicos dado su parecido como la fase mineral natural de los huesos que favorece la regeneración del mismo (26).

La hidroxiapatita se clasifica como una cerámica bioactiva, su composición es similar a la fase mineral del hueso que se caracteriza porque se une directamente al hueso sin formación de tejido conectivo en el medio; se considera como un material idóneo tanto para la restauración como para la sustitución ósea (3), por su habilidad para formar enlaces fuertes con el tejido duro (27). Por muchos años, los fosfatos de calcio, principalmente la hidroxiapatita, han jugado un papel importante en la ingeniería de biomateriales debido a su alta biocompatibilidad y bioactividad en tejido humano mineralizado (huesos, esmalte, dentina, cemento) (28-30). La bioactividad de la hidroxiapatita aumenta conforme disminuye su cristalinidad (11). Además puede utilizarse en aplicaciones que permitan también la distribución de fármacos, rellenos en hueso periodontal, aumento del contorno alveolar, y para el llenado en sitios de extracción dental para la conservación del contorno del reborde alveolar, gracias a su estabilidad a condiciones de pH, composición y temperaturas fisiológicas (28, 31-36). También se ha utilizado para recubrir prótesis metálicas para mejorar sus propiedades biológicas (30, 37) y acelerar el proceso de osteointegración (35).

Ya que cuenta con propiedades mecánicas pobres, la hidroxiapatita se utiliza como sustituto de hueso en lugares donde no hay gran tensión. Los materiales de hidroxiapatita son el componente perfecto de composites para implantes con polímeros sintéticos y biopolímeros. Las biocerámicas densas de hidroxiapatita pueden tomar formas deseadas y se pueden utilizar para implantes de oído medio y ojos (35).

Debido a su capacidad para intercambiar iones, la ingeniería de materiales ha podido introducir en la estructura de la hidroxiapatita pequeñas cantidades de algunos iones que pueden mejorar sus propiedades biológicas, fisicoquímicas o mecánicas (10). La tasa de intercambio iónico es muy alta con metales pesados como Pb^{+2} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ag^{+} , etc. (38).

Los cationes de plata (Ag^{+}) son microbicidas a bajas concentraciones y se han utilizado para tratar quemaduras, heridas, úlceras, como recubrimiento de catéteres para retardar el

desarrollo de biofilm bacteriano, etc. (39, 40). La plata generalmente no presenta efectos adversos a los humanos (en bajas concentraciones). Los compuestos de plata se utilizan ampliamente como efectivos agentes antimicrobiales para combatir patógenos tanto en clínica como en salud pública (39).

La utilización de la plata se ha convertido en un método para conferir resistencia microbiana en biomateriales y artículos médicos. Los compuestos de plata son altamente antimicrobianos debido a sus propiedades antisépticas ante microorganismos gram positivos y gram negativos, virus y hongos y más de 16 tipos de bacterias incluyendo *Escheriachia coli* y *Staphylococcus aureus* (41). Un agente antimicrobial posee propiedades antivirales, antibacteriales y/o antifúngicas. Los antivirales y antifúngicos son capaces de matar o suprimir la replicación de virus y hongos respectivamente. Los antibacteriales pueden ser bacteriostáticos o bactericidas. Los bacteriostáticos inhiben el crecimiento de microorganismos, mientras que los bactericidas los matan. Los compuestos a base de plata que tienen propiedades antimicrobianas, han capturado mucha atención debido a la baja toxicidad del ion plata activo en las células humanas, así como también por ser un biocida duradero con alta estabilidad térmica y baja volatilidad (27, 42).

La plata iónica (Ag^+) es considerada efectiva ante un amplio rango de microorganismos, a bajas concentraciones se ha documentado que tiene actividad terapéutica (42-44). La plata se ha descrito como oligodinámica debido a su habilidad de ejercer un efecto bactericida a bajas concentraciones (de 10^{-9} a 10^{-6} M) (42). Además se ha encontrado que las bacterias muestran una baja propensión a desarrollar resistencia a los productos que contienen plata (44).

En las bacterias, los iones de plata reaccionan con los residuos de aminoácidos nucleofílicos en las proteínas y se unen a los grupos sulfhidrilo, amino, amidazol, fosfatos y carboxilos de la membrana o de enzimas que llevan a la desnaturalización de las proteínas localizadas en la membrana celular y en el citoplasma. La plata también inhibe un numero de enzimas oxidativas

tales como la alcohol deshidrogenasa, la entrada de succinato por las vesículas de la membrana y la cadena transportadora de electrones de la *E. coli*; los iones de plata interactúan con las moléculas de DNA, causando su condensación y pérdida de capacidad para replicarse. Uno de los primeros blancos de la plata, específicamente a bajas concentraciones, parece ser el Na^+ traslocador de NADH: sistema de ubiquinona oxidoreductasa. Bajos niveles de plata colapsan la fuerza protón motriz de la membrana de la bacteria, generando una desenergización y posterior muerte de la célula (41, 42).

La forma más común de incorporar la plata en los recubrimientos de hidroxiapatita es por intercambio iónico en el que los iones de Ca^{2+} de la hidroxiapatita son remplazados por los iones plata (Ag^+) (38, 45). La forma más común de incorporar la plata en la estructura de la hidroxiapatita es utilizando nitrato de plata (27, 45).

El contenido de plata en este tipo de compuestos es crítico para garantizar un efecto antibacterial óptimo sin citotoxicidad (altas concentraciones pueden ser tóxicas). Cuando se prepara hidroxiapatita con plata, el espectro antibacterial es amplio como el de la plata iónica e incluye, como se mencionó anteriormente, bacterias, virus y hongos. Un contenido de plata tan pequeño como 0.2% en la formulación tiene un efecto inhibitorio del crecimiento de *K. pneumoniae* y *C. krusei*. Para tener un efecto contra *S. aureus* y *S. epidermidis* se necesita un contenido de plata entre 1% y 2% en peso (41, 45).

Una cantidad excesiva de plata en la formulación de hidroxiapatita puede ser tóxica no solo a los microorganismos sino a los tejidos animales, y puede llevar a la inhibición de crecimiento. La selección de la cantidad apropiada de plata para la preparación de HA con Ag es importante ya que debe ser lo suficientemente alta para combatir efectivamente los microorganismos pero lo suficientemente baja para no dañar la condición de los tejidos animales. Una alta concentración de Ag puede llegar a ocasionar la muerte de las células. La complejidad del problema para balancear entre una actividad antimicrobiana efectiva y una actividad citotóxica

no solo incluye el contenido total de plata en la formulación de hidroxiapatita, sino incluye también las condiciones de la síntesis y el método de secado y tratamiento térmico (41).

La combinación de fosfatos de calcio con plata generan un material (cerámico o nanoparticulado) que tiene el potencial de ser biocompatible y bactericida (46).

Por otra parte, la estructura de la hidroxiapatita puede ser fácilmente sustituida con iones flúor (F^-) generando fluorapatita. Comparada con la hidroxiapatita, la fluorapatita es menos soluble, más resistente a la degradación química y tiene mejor estabilidad térmica. Esta última característica hace que la aplicación de flúor en los órganos dentarios se utilice para la prevención de la caries dental, ya que inhibe la desmineralización y promueve la remineralización de la capa de esmalte del órgano dentario (11, 47). Sin embargo, la dosis óptima de flúor que genere un efecto positivo en la remineralización del esmalte con un mínimo de riesgo de toxicidad no ha sido bien documentada (19). La fluorapatita también almacena F^- , y se ha demostrado que estimula la proliferación de las células formadoras de hueso (48).

Existen numerosos métodos para sintetizar la hidroxiapatita, entre ellos destacan la vía húmeda y seca, la hidrólisis, el proceso hidrotermal, la síntesis mecanoquímica, el proceso sol-gel, la vía sonoquímica, las rutas a través de cementos de fosfatos de cálcicos (12) y combustión, entre otras (49).

COMBUSTION

La sinterización por combustión o síntesis por auto propagación de alta temperatura, es un método rápido, de bajo costo y eficaz para la obtención de polvos cerámicos, metálicos, vidrios, cementos, composites, amalgamas y nanomateriales (50, 51). La técnica de síntesis por

combustión involucra una reacción química exotérmica entre nitratos metálicos y un combustible orgánico (31), bajo un esquema exotérmico regido por el principio de óxido-reducción (52). Este proceso se caracteriza por altas temperaturas, rápidas tasas de calentamiento y tiempos de reacción reducidos; dependiendo de la naturaleza de la combustión se puede lograr una flama durante el proceso o no formar flama (52).

Dentro de los principios básicos de la combustión se necesita la presencia de un combustible que pueda oxidarse con los reactivos o precursores de la síntesis (comburente) y energía; en este caso se utiliza como fuente energética el calor liberado en la reacción a partir de los reactivos, dando lugar a un proceso auto sostenido. La elección del combustible es un punto muy sensible en este método ya que la exotermicidad de la combustión varía con el combustible, modificando con esto las características de los productos logrados. Además el combustible sirve como fuente de carbono e hidrógeno que en la combustión sirven para formar dióxido de carbono (CO_2) e hidrógeno (H_2) y liberar calor, además forman complejos con los iones metálicos facilitando la homogeneidad de la mezcla de cationes (52).

Debido a que se debe cumplir cierta termodinámica, es importante realizar la mezcla de combustible-comburente de manera estequiométrica y esto se ha logrado en los términos de razón de equivalencia o coeficiente estequiométrico de los elementos.

En 1981, Jain y col. propusieron la siguiente ecuación para calcular la cantidad de combustible necesario y así obtener una mezcla estequiométrica (18):

$$\sum (Coef. elem. reductores \times valencia) + \sum (coef. elem. oxidantes \times valencia) = 0$$

En cuanto a los combustibles, la urea es uno de los que se emplean con mayor frecuencia, aunque también puede utilizarse tetraformato de triazina, hidrazida maleica, carbohidrazida, glicina sacarosa, carbamida, ácido cítrico, ácido ascórbico, etc. (50, 51, 53), todos ellos difieren entre sí por su poder reductor y por la cantidad de gases que liberan durante la combustión,

puntos muy importantes para determinar las condiciones de reacción así como la morfología y composición de los productos obtenidos. La urea y la glicina son populares como combustibles debido a que favorecen la producción de polvos con estequiometría controlada (51).

La naturaleza de los precursores es otro factor que se debe considerar; para este tipo de sinterización, se suelen utilizar nitratos hidratados ya que estos tienen gran poder oxidante y funden a bajas temperaturas, lo que a fin de cuentas ayuda a superar la barrera de energía de activación de la reacción garantizando además la formación de una mezcla homogénea a una temperatura inferior a la de descomposición del combustible (50). Por esta razón algunos autores consideran que la síntesis de bionanomateriales se puede lograr a bajas temperaturas. Durante el proceso de la combustión se liberan gases lo que contribuye a las características físicas del material sinterizado, pues favorecen la formación de estructuras más esponjosas y con una mayor superficie específica (50).

Hoy en día la síntesis por combustión se ha convertido en un método muy popular para la preparación de nanomateriales y ha sido utilizada en al menos 65 países (51). Dependiendo la naturaleza de los precursores, los (nano) polvos obtenidos cuentan con diversas propiedades que abren muchas posibilidades para aplicaciones prácticas, entre ellas, en el área médica como implantes óseos (incluyendo los dentales) y otras aplicaciones odontológicas.

La síntesis por combustión se divide de acuerdo en la naturaleza física del medio de la reacción inicial, en la figura 3 se muestra un diagrama de la clasificación de la combustión:

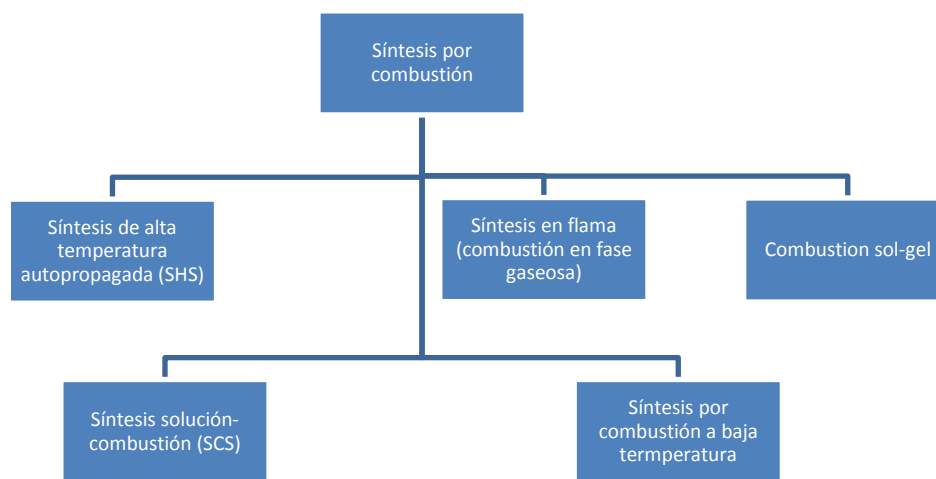


Figura 3. Clasificación del método de síntesis por combustión.

En la síntesis convencional de combustión (combustión autopropagada en alta temperatura, SHS), los reactantes (precursores) iniciales se encuentran en estado sólido. Debido a que los precursores están en estado sólido, a la SHS también se le conoce como combustión en estado sólido (CSC) o combustión en fase condensada. Esta síntesis por combustión puede incluir algunas variantes para obtener nanomateriales, esto incluye la síntesis por combustión autopropagada en alta temperatura seguida de: molido intenso, activación mecánica, tratamiento térmico (dispersión química), más aditivos; además se puede utilizar la síntesis de combustión por carbón (CCS) (51).

La síntesis de combustión por solución (SCS) es un método muy sencillo, versátil y rápido para obtener materiales nanoparticulados. En este método se hace presente una reacción autosostenida en una solución homogénea de diferentes oxidantes (nitratos metálicos) y combustibles (urea, glicina, hidracinas). Dependiendo el tipo de precursores y de las condiciones utilizadas, la SCS puede ocurrir ya sea en un proceso de combustión de

propagación en volumen o por capas; este método permite obtener materiales nanoparticulados, pero además permite introducir pequeñas trazas de impurezas en el material (51).

BIOCOMPATIBILIDAD

El término biocompatibilidad se define como la habilidad de un material para generar una adecuada respuesta en el huésped, en una aplicación específica (54, 55), y que ha alcanzado cierto estándar de seguridad y eficacia en determinadas situaciones (56), ya que de acuerdo a la aplicación del biomaterial entonces se analizarán los requerimientos biológicos. Es decir, un biomaterial debe tener la habilidad de co-existir en contacto con tejido humano sin causar un daño inaceptable al organismo, ya que se espera que estos materiales permanezcan en el individuo por tiempos prolongados (57). Es una condición que los biomateriales logran en función de la respuesta del tejido que entra en contacto con éste en un modelo animal (56).

El concepto de biocompatibilidad se puede dividir en dos principios: bioseguridad y biofuncionalidad (11, 58). El principio de bioseguridad menciona que los materiales no deben (ya sea directamente o a través de la liberación de sus constituyentes): producir efectos adversos locales o sistémicos, ser carcinogénico, producir efectos adversos reproductivos o en el desarrollo (11). El principio de biofuncionalidad se refiere a la función del material en un tejido en particular.

Los materiales biocompatibles incluyen aquellos que son químicamente inertes o bioactivos que cuentan con ciertos grupos funcionales que reaccionan con el tejido que los rodea o que generan ciertos cambios en su composición química *in vivo*, frecuentemente liberando ciertos agentes para generar una respuesta biológica específica. Un aspecto importante para comprender mejor la biocompatibilidad de un biomaterial es determinar con antelación cuáles

serán los mecanismos químicos, bioquímicos, fisiológicos, y físicos, entre otros, que se activaran bajo las condiciones específicas asociadas con el contacto entre el biomaterial y los tejidos del cuerpo y cuáles serán las consecuencias de éstas interacciones.

Debido a que la respuesta del tejido u órgano que entra en contacto con el biomaterial dependerá del proceso herida-sanación particular a cada uno de ellos, la biocompatibilidad de un mismo material podrá ser diferente de acuerdo a las condiciones de aplicación/implantación y del tejido u órgano con el que entre en contacto, de esta forma la biocompatibilidad no es una propiedad invariante del biomaterial sino que también dependerá de las condiciones de uso (56, 57).

La biocompatibilidad se puede ver afectada por los siguientes factores (56):

- a) el “espacio muerto” creado por la presencia del biomaterial;
- b) agentes solubles (iones o fragmentos moleculares) que se liberan por el biomaterial;
- c) partículas insolubles liberadas por el biomaterial;
- d) interacciones químicas entre el biomaterial y moléculas biológicas;
- e) alteraciones en la distribución de tejido debido a que el biomaterial no se ajusta a las características del tejido que lo rodea, o debidas al movimiento del biomaterial en el tejido.

La biocompatibilidad de un material dependerá también de ciertos aspectos diferentes del material en sí, por ejemplo de la naturaleza de la intervención clínica con la que se pone en contacto el material con los tejidos; además también se deben de considerar las características del individuo en el cual se colocará el material (57).

Los ensayos de biocompatibilidad pueden ser *in vitro* o *in vivo*. Los ensayos *in vitro* más comunes utilizan cultivos celulares para la identificación de citotoxicidad, adhesión, activación o muerte celular. Se usan para comprender el mecanismo de respuesta celular a los materiales a

nivel molecular (11). Son utilizados ampliamente en estudios o análisis de biocompatibilidad para nuevos biomateriales, dispositivos médicos y prótesis.

Los ensayos *in vivo* se utilizan para determinar si el biomaterial realiza la función para la que fue diseñado y evalúa el daño que pudiera generar en los tejidos del huésped. Dentro de las pruebas *in vivo* que se realizan en modelos animales se encuentran las siguientes: sensibilización, irritación, reactividad intracutánea, toxicidad sistémica (aguda), toxicidad sub-aguda/ sub-crónica, genotoxicidad, implantación, hemocompatibilidad, toxicidad crónica, carcinogenicidad, toxicidad reproductiva, biodegradación, toxicocinética e inmunotoxicidad.

De estos, uno de los más comunes es colocar el biomaterial en el huésped a través de implantación para evaluar los efectos patológicos locales que se generan a partir de cambios histológicos en el tejido. Para pruebas a corto plazo (hasta 12 semanas) en donde se implanta el biomaterial generalmente se utilizan animales como sujetos de estudio que pueden ser: ratones, ratas, cerdo de guinea o conejos (55). Cuando se coloca el material *in vivo*, éste se puede inyectar, insertar o implantar quirúrgicamente, causando lesiones en el tejido u órganos involucrados que reaccionan generando ciertas respuestas para mantener la homeostasis, el grado de respuesta acompañado de ciertas condiciones fisiopatológicas determinan la biocompatibilidad del biomaterial.

La biocompatibilidad de un material que entra en contacto con tejido se ha descrito en términos de la respuesta inflamatoria (aguda y crónica) y también de la formación de cápsula fibrosa que se ha observado en diferentes periodos de tiempo posteriores a la implantación del material. (59).

La inflamación, definida como la reacción de tejido vivo vascularizado ante una lesión local, ayuda a observar éste fenómeno y establece el precedente de evaluación para la determinación de la biocompatibilidad. La inflamación sirve para contener, neutralizar, diluir o

generar barreras con el agente que causó la lesión; también genera una serie de eventos que pueden conducir a la recuperación y reconstitución del tejido en el sitio en donde se colocó el biomaterial a través de la regeneración de las células parenquimales nativas, formación de tejido cicatrizal fibroblástico o por la combinación de ellos. Cuando se implanta un biomaterial, generalmente después del primer día, la respuesta del tejido para recuperarse o sanarse inicia por la acción de monocitos y macrófagos, seguidos de la proliferación de fibroblastos y células vasculares endoteliales en el sitio del implante, llevando a la formación de tejido granular. En la Figura 4 se presenta un esquema con la secuencia del proceso fisiológico de curación de una herida.

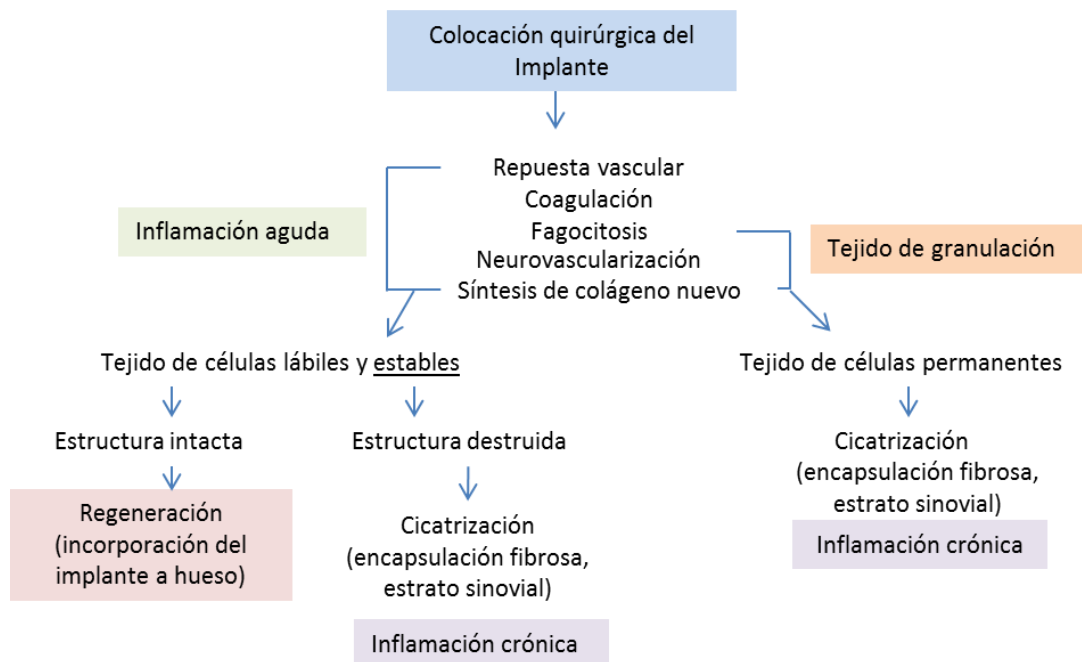


Figura 4. Secuencia de proceso fisiológico de curación de una herida.
Traducido de M. Spector, The concept of biocompatibility.

Las células presentes en una respuesta inflamatoria varían de acuerdo al tiempo de la lesión. De manera general, los neutrófilos, comúnmente llamados leucocitos polimorfonucleares, predominan durante los primeros días después de la lesión e implantación del biomaterial,

posteriormente son reemplazados por monocitos. Tres factores intervienen en este cambio de células: a) los neutrófilos tienen un tiempo de vida corto, se desintegran y desaparecen después de 24-48 hrs; la migración de neutrófilos es de corta duración porque los factores quimiotácticos se activan rápidamente en la respuesta inflamatoria; b) emigrando de los vasos sanguíneos los monocitos se diferencian en macrófagos que tienen un tiempo de vida que puede durar meses; c) la migración de monocitos puede continuar hasta semanas, dependiendo de la lesión ocasionada al momento de implantar el biomaterial.

El tamaño, forma y propiedades fisicoquímicas del biomaterial determinarán las variaciones en la intensidad y tiempo de duración de la respuesta inflamatoria y del proceso de sanación de la herida. De esta forma, la intensidad y/o duración de la respuesta inflamatoria caracterizará la biocompatibilidad del biomaterial, misma que se describe en términos de la apariencia morfológica de la respuesta inflamatoria a dicho material. La respuesta inflamatoria puede ser aguda o crónica. La inflamación aguda es de corta duración, puede durar minutos o días dependiendo de la extensión de la lesión. La principal característica de este tipo de inflamación es la exudación de fluido y proteínas del plasma generando edema y la migración de leucocitos (predominantemente neutrófilos). La acumulación de leucocitos, particularmente neutrófilos y monocitos, es la característica más importante de la reacción inflamatoria. La inflamación crónica, histológicamente, es menos uniforme que la aguda, y se caracteriza por la presencia de monocitos y linfocitos con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo. Un estímulo persistente en el fenómeno de inflamación conduce a la inflamación crónica. Nuevamente las características del biomaterial pueden conducir a este tipo de inflamación, sin embargo también se debe considerar el movimiento del biomaterial en el sitio del implante, generalmente es de muy corta duración. Los macrófagos juegan un papel importante en la inflamación crónica debido a la producción de sustancias biológicamente activas.

En la Tabla 1 se muestra una tabla resumen con las características principales que el hospedador presenta como respuesta a la presencia de biomateriales.

Tabla 1. Respuestas características del hospedador ante la presencia de biomateriales.

Adsorción y desorción de proteínas	Adhesión, activación y agregación de plaquetas
Efectos citotóxicos generalizados	Activación de complementos
Activación de neutrófilos	Producción de anticuerpos, respuesta inmune
Activación de macrófagos, producción de células gigantes a cuerpo extraño, formación de tejido granular	Hipersensibilidad aguda / anafilaxis
Comportamiento de fibroblastos y fibrosis	Hipersensibilidad Retardada
Cambios microvasculares	Respuesta mutagénica, genotoxicidad
Respuestas celulares específicas de órganos /tejidos	Toxicidad reproductiva
Activación de cascada de coagulación	Formación de tumores

Adaptado de: Williams David F. On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials 29 (2008).

Las respuestas que hacen considerar a un material como no biocompatible incluyen: a) respuesta inflamatoria persistente; b) dolor; c) citotoxicidad y necrosis; d) cambios tisulares que resultan incompatibles o interfieren con la función material (56).

Las técnicas recomendadas para la realización de pruebas biológicas de materiales dentales se presentan en el documento ANSI/ADA No.41 *Recommended standard practices for biological evaluation for dental materials* (prácticas estandarizadas recomendadas para la evaluación biológica de materiales dentales propuestas por el American National Standards Institute y American Dental Association), en este documento se plantea la realización de tres tipos de pruebas diferentes para la evaluación de los materiales: pruebas primarias, que proporcionan perfiles toxicológicos generales del material (ensayos *in vitro* e *in vivo* de citotoxicidad,

hemólisis, pruebas de Ames, pruebas de Styles, toxicidad sistémica vía oral, toxicidad sistémica vía peritoneal e inhalación aguda); pruebas secundarias, que evalúan la toxicidad local (irritación mucosa, toxicidad dérmica, implantes subcutáneos, implantes en hueso, implante intramuscular) y; pruebas de uso *in vivo* (aplicación de los materiales en su contexto previsto, primero en animales de mayor tamaño, primates y finalmente en humanos) (54, 60). La evaluación histológica del tejido adyacente al material implantado es un método muy utilizado para evaluar la biocompatibilidad de materiales (59, 60).

1.3 PROBLEMA

Existen pocos nanomateriales para la remineralización del esmalte del órgano dentario cuando éste presenta desmineralización, para su uso como medio preventivo y de remineralización de órganos dentarios en el campo de la odontología mexicana; además es difícil su adquisición, pues se manufacturan en otros países, como Estados Unidos, Brasil, Portugal o España.

1.3.1 PREGUNTA

¿Se podrán sintetizar materiales de hidroxiapatita dopados con plata y flúor con dimensiones a nanoescala que sean biocompatibles y tengan las características de poder remineralizar el esmalte dental?

2. JUSTIFICACIÓN.

Debido a que la desmineralización del órgano dentario, ocasionada por los hábitos de consumo en donde las ingestas de alimentos y productos que afectan directamente el cambio del pH de la saliva, ha favorecido la aparición de caries dental, observándose desde edades muy

tempranas; se tiene la viabilidad de desarrollar bionanomateriales que ayuden a la remineralización de los tejidos del órgano dentario.

Este estudio pretende dar respuesta a esa necesidad, mediante la síntesis de bionanomateriales de hidroxiapatita dopados con plata y flúor que sean biocompatibles y que puedan tener la función tanto de remineralizar el esmalte dental en etapas tempranas como de prevenir la lesión cariosa.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Elaborar (sinterizar) una serie de biomateriales nanoestructurados a base de hidroxiapatita con inclusión de plata y flúor, caracterizarlos fisicoquímicamente y evaluar su biocompatibilidad.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Formular composiciones de bionanomateriales a base de hidroxiapatita con y sin agente dopante; plata y flúor.
2. Definir el proceso de sinterización por medio del método de combustión y tratamiento térmico posterior para la obtención de los materiales a base de hidroxiapatita.
3. Realizar un análisis de caracterización química del bionanomaterial mediante técnicas de Espectroscopía Infrarroja (IR) y Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS).
4. Determinar la composición mineralógica de las fases generadas por Difracción con Rayos X (DRX).
5. Evaluar su composición morfológica mediante Microscopía Electrónica: de Barrido (MEB), de Fuerza atómica (MFA) y Transmisión (MET).

-
6. Evaluar la biocompatibilidad de los materiales aplicando un estudio *in vivo* utilizando ratas Wistar a diferentes tiempos (7, 14, 30 y 90 días) observando su respuesta inflamatoria.

4. HIPÓTESIS

La síntesis de un bionanomaterial de hidroxiapatita con plata y flúor como agentes dopantes será biocompatible.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio experimental.

5.2 UNIVERSO DE ESTUDIO

Este estudio se desarrolla en fases, en la primera y segunda fases, el universo de estudio corresponde al mismo biomaterial sinterizado pues se analizará y se caracterizará fisicoquímicamente.

En la tercera fase del proyecto se realizarán pruebas de biocompatibilidad por lo que el universo de estudio se centrará en el estudio de los roedores y su respuesta al material.

5.3 CRITERIOS

5.3.1 INCLUSIÓN

En la tercera fase del proyecto de tesis se contempla la utilización de roedores con las siguientes características: rata Wistar, hembra, adulta, con un peso entre 300 y 400 g, alojadas en jaulas convencionales en un cuarto con ventilación y luz artificial y en condiciones de espacio y manejo de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

5.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Para el desarrollo de este proyecto se ha definido como variable independiente el biomaterial de hidroxiapatita dopado con plata y flúor; y como variable dependiente se ha identificado la biocompatibilidad. En la tabla 2 se muestran las definiciones para cada una de éstas.

Tabla 2. Operatividad de las variables

	VARIABLE	DEFINICIÓN	FORMA DE MEDICIÓN	
INDEPENDIENTE	Biomaterial de hidroxiapatita con plata y flúor	Material inorgánico de fosfato de calcio con iones hidroxilo, plata y flúor	No aplica	
DEPENDIENTE	Biocompatibilidad	Habilidad de un material de actuar con una adecuada respuesta – biológica- al huésped, en una aplicación específica –sobre un tejido.	Respuesta inflamatoria: • Aguda (presencia de exudado rico en proteína y leucocitos polimorfonucleares neutrófilos). • Crónica (presencia de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, fibroblastos), • Crónica granulomatosa (presencia de acumulación de macrófago modificado formado granulomas).	Categorías del grado de inflamación • Leve: 10 células por campo • Moderado: de 10 a 25 células por campo • Severo: más de 25 células por campo

5.5 MÉTODOS

La parte experimental de este proyecto se desarrolló en tres fases, en la figura 5 se muestra el diagrama de flujo general del proyecto.

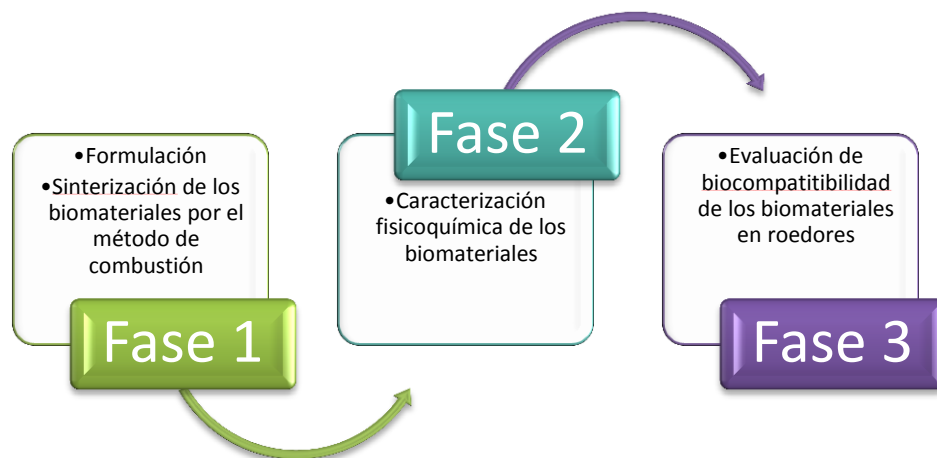


Figura 5. Fases del desarrollo del proyecto

FASE I: FORMULACIÓN Y SÍNTESIS

La primera fase se realizó en la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California y consistió en la formulación, preparación y obtención de tres formulaciones distintas: hidroxiapatita (HA), hidroxiapatita con flúor (HA-F) e hidroxiapatita dopada con plata y flúor (HA-Ag-F). Primeramente se consultó la fórmula general de la hidroxiapatita y fluoroapatita y se buscaron los precursores ideales para obtener biomateriales de características similares en cuanto a fórmula general pero con la presencia de los agentes dopantes deseados (flúor y plata-flúor). La sinterización de estos biomateriales se realizó por el método de combustión. En la tabla 3 se muestra la relación de los precursores y combustible utilizados. Para la sinterización de hidroxiapatita se utilizaron el nitrato de calcio hidratado y el fosfato de amonio dibásico como precursores, para la sinterización de la hidroxiapatita con flúor se añadió fluoruro de calcio a la formulación anterior, y para la sinterización de hidroxiapatita dopada con plata y flúor se añadió a la formulación de hidroxiapatita el acetato de flúor y plata. En los tres casos se utilizó urea como combustible.

Tabla 3. Precursores y combustible utilizados

Precursor	Fórmula
Nitrato de calcio hexahidratado	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Fosfato de amonio dibásico	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
Acetato de flúor y plata	$\text{C}_2\text{F}_3\text{O}_2\text{Ag}$

Combustible	Fórmula
Urea	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$

Se utilizó el método propuesto por Jain y col. (50) para calcular la cantidad de combustible necesario para la preparación de una mezcla estequiométrica combustible-oxidante, en la tabla 4 se muestran las cantidades utilizadas para la preparación de una muestra de 5 gr.

Tabla 4. Cantidades estequiométricas para la preparación de la mezcla combustible-oxidante

Compuesto	Cantidad (g)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.4231
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1.3446
$\text{C}_2\text{F}_3\text{O}_2\text{Ag}$	0.3635
$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	0.5488

La preparación de la mezcla se realizó pesando en una balanza analítica (AND HR-120, max 120 g, d=0.1 mg, NS12300551) cada uno de los compuestos, posteriormente se homogenizó la muestra por un periodo de aproximadamente de 25 min (figura 6).

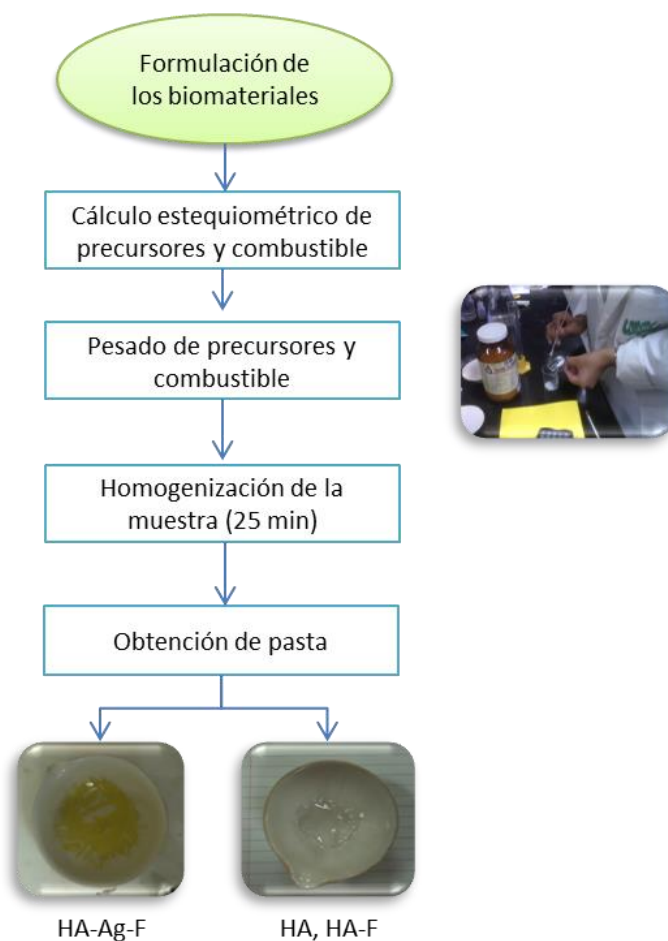


Figura 6. Diagrama de flujo de la preparación de los biomateriales

Para llevar a cabo la combustión se utilizó flama directa a través de un sistema armado a flama directa (mechero meker). Al poco tiempo de iniciar el calentamiento comenzó la reacción de combustión observándose el desprendimiento de gases blancos y la mezcla comenzó a hervir, posteriormente se observó la formación de una película porosa blanca (para las formulaciones de hidroxiapatita e hidroxiapatita-flúor) y blanca-amarillenta (para la formulación de

hidroxiapatita con plata-flúor). Se continuó el calentamiento hasta el cese de gases. Se dejó enfriar, para posteriormente volver a homogenizar mediante molienda y se procedió a realizar el tratamiento térmico adicional en un horno de alta temperatura marca Thermolyne modelo 46100, a 600°C, con las siguientes condiciones: calentamiento con una velocidad de 5°C por minuto por un tiempo de 4 horas (estabilidad térmica). En la figura 7 se muestra el diagrama de flujo de la combustión y tratamiento térmico.

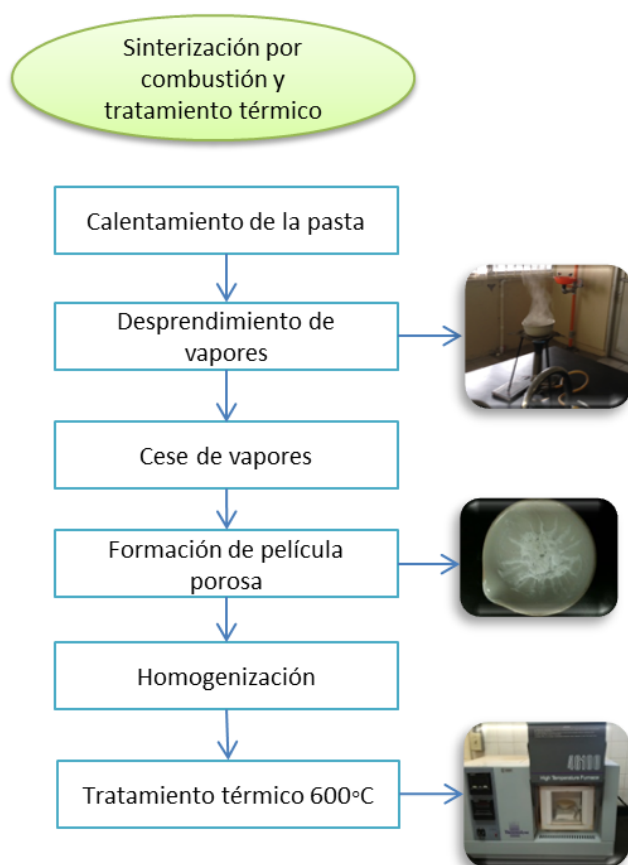


Figura 7. Diagrama de flujo de la obtención de biomaterial por combustión y tratamiento térmico.

FASE II: CARACTERIZACIÓN MICROESTRUCTURAL DE LAS FORMULACIONES

La segunda fase incluyó la caracterización fisicoquímica de los biomateriales obtenidos mediante el uso de diversas técnicas. En la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la

Universidad Autónoma de Baja California se realizó el análisis de los grupos funcionales presentes en las muestras mediante el uso de espectroscopía de absorción en infrarrojo; en el Instituto de Investigación de Materiales de la Universidad Nacional Autónoma de México se realizaron las siguientes técnicas de caracterización: difracción de rayos X (DRX) para la determinación de las fases cristalinas, microscopía electrónica de barrido (MEB) para determinar la morfología y tamaño de partícula, microscopía de fuerza atómica (MFA) para determinar la morfología y tamaño de partícula, y microscopía electrónica de transmisión (MET) para determinar tamaño de partícula y patrón de difracción; y en el Departamento de Investigación en Física de la Universidad de Sonora se realizó la técnica de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS, por sus siglas en inglés) para la identificación iónica elemental.

Espectroscopía de absorción en infrarrojo

Es un tipo de espectroscopía de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético. Como las demás técnicas espectroscópicas, puede ser utilizada para identificar grupo(s) funcional(es) de un compuesto por la absorción de la radiación infrarroja por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula (61). Hay dos tipos básicos de vibraciones: tensión y flexión. Una vibración de tensión supone un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces y son de cuatro tipos: tijereteo, balanceo, aleteo y torsión (62). La espectroscopía infrarroja tiene una gran aplicación en el análisis cualitativo y cuantitativo. La región infrarroja del espectro incluye la radiación con números de onda comprendidos entre los 12 800 y los 10 cm^{-1} y se divide en tres regiones denominadas infrarrojo cercano, medio y lejano, en la tabla 5 se muestran las regiones del espectro infrarrojo (IR)(62).

Tabla 5. Regiones del espectro infrarrojo

Región	Intervalo de longitud de onda (λ), μm	Intervalo de números de onda (ν), cm^{-1}	Intervalo de frecuencias (ν), Hz
Cercano	0.78 a 2.5	12 800 a 4 000	3.8×10^{14} a 1.2×10^{14}
Medio	2.5 a 50	4000 a 200	1.2×10^{14} a 6.0×10^{12}
Lejano	50 a 1000	200 a 10	6.0×10^{12} a 3×10^{11}
La más utilizada	2.5 a 670	4000 a 670	1.2×10^{14} a 2.0×10^{13}

Fuente: Skoog, Holler, Nieman, Principios de análisis instrumental, 5ta edición. Mc Graw Hill

Esta técnica funciona casi exclusivamente en enlaces covalentes y se usa en química, particularmente en química orgánica, sin embargo cada molécula presenta un espectro IR característico debido a que todas las moléculas tienen algunas vibraciones que, al activarse, provocan la absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo. El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de ésta molécula, por tal razón se puede utilizar al espectro IR como una huella dactilar en la identificación de muestras desconocidas mediante la comparación con espectros de referencia. Analizando las longitudes de onda que absorbe una sustancia en esta zona, se puede obtener información sobre las moléculas que componen dicha sustancia.

Esta técnica genera un gráfico denominado espectro en donde se muestran las bandas que son típicas de grupos funcionales particulares y que tienen localizaciones e intensidades específicas dentro de los espectros infrarrojos. Las intensidades en las bandas del espectro de una mezcla, son generalmente proporcionales a las concentraciones de los componentes individuales (63).

Los componentes básicos de un instrumento de infrarrojo son una fuente de luz, un elemento de dispersión y un detector. La fuente de luz puede ser una lámpara halógena incandescente.

Los elementos comunes de dispersión incluyen redes de difracción, filtros de interferencia y prismas de cuarzo, estos elementos generalmente giran para ajustar físicamente la parte del espectro infrarrojo dispersado que pasa a través de la muestra. Una serie de espejos internos en el instrumento funcionan para transferir la luz dispersada desde la fuente al elemento de dispersión, después a través de la muestra y al detector. El detector debe captar las longitudes de onda que han sido absorbidas por una muestra y en qué medida.

Debe responder rápidamente a la luz de entrada para permitir que el espectro IR sea escaneado a través de una cantidad de tiempo razonable y generar poco ruido electrónico para maximizar la sensibilidad. Típicamente los detectores son semiconductores fotosensibles que producen una señal de tensión proporcional a la intensidad de la luz que reciben. Dentro del equipo debe existir un compartimento en el que se coloca el soporte con la muestra. El equipo está conectado a una computadora con un programa específico en el que se generan los espectros.

Esta técnica permite el estudio de prácticamente cualquier muestra independientemente del estado físico en el que se encuentre. Las muestras líquidas se prensan entre dos celdas circulares de una sal de alta pureza, transparentes a la luz infrarroja por lo que no emiten ninguna línea en el espectro de la muestra. Debido a que las celdas son solubles en agua, la muestra, los reactivos de lavado y el medio deben ser anhidros. Las muestras sólidas se preparan mezclando cierta cantidad de muestra con una sal altamente purificada (generalmente bromuro de potasio). Esta mezcla se tritura y se prensa con el fin de formar una pastilla por la que pueda pasar la luz. La pastilla se prensa a altas presiones para asegurar que sea translúcida.

En la figura 8 se muestra el procedimiento seguido para la preparación de las muestras y análisis por espectroscopía infrarroja, se realizó para cada una de las formulaciones. Se utilizó un espectrofotómetro Perkin-Elmer 1600 series FT-IR en el rango de 1500 a 380 cm^{-1} .

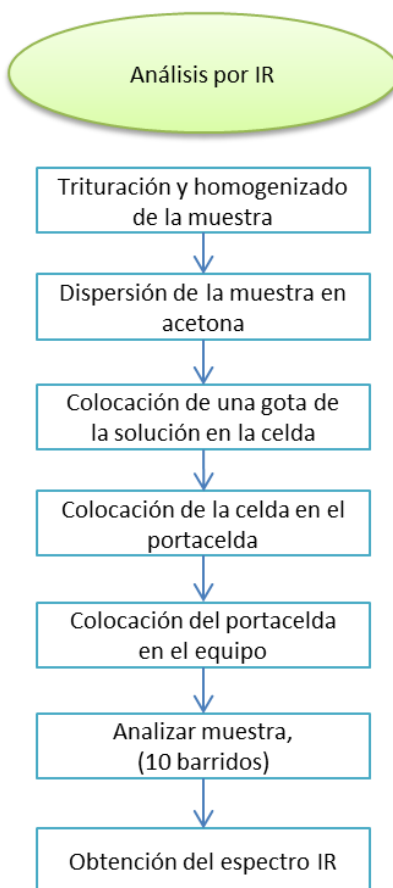


Figura 8. Procedimiento para el análisis por espectroscopía infrarroja.

Espectroscopía de fotoelectrones de rayos-X (XPS)

La espectroscopía de fotoelectrones de rayos-X (XPS, por sus siglas en inglés) es una técnica que mide la composición elemental, fórmula empírica, estado químico y estado electrónico de los elementos existentes en un material. Los espectros XPS se obtienen irradiando al material con un haz de rayos X mientras que se mide simultáneamente la energía cinética y el número de electrones que escapan en los primeros 10 nm del material analizado (64).

La espectroscopía de fotoelectrones generados por rayos X consiste en excitar una superficie con fotones de rayos X, con lo que se extraen electrones de los átomos de la muestra a

analizar. La medida de la energía de ligadura de los electrones de los niveles internos de los átomos (localizados en una región superficial de unas pocas capas atómicas) así como las intensidades de los picos de fotoemisión permite determinar el estado de oxidación y la concentración de los átomos superficiales (65). Esta técnica permite identificar todos los elementos presentes (excepto H y He, ya que no tienen niveles electrónicos internos) en concentraciones mayores a 0.1% (64). Proporciona información sobre el entorno molecular de las muestras analizadas de tal forma es posible conocer el estado de oxidación, los átomos enlazantes, orbitales moleculares, etc. En un análisis de XPS se realiza un barrido amplio del espectro, cubriendo intervalos de 1000 eV, y después se evalúa con más detalle intervalos más pequeños (de unos 20 eV).

Los componentes primarios de un instrumento XPS son el sistema de vacío, la fuente de rayos X, un analizador de energía y un sistema de datos. La parte central del equipo es la cámara principal de vacío en la que la muestra es analizada, ya que los fotoelectrones deben viajar desde la muestra hasta el detector sin colisionar con ninguna partícula de fase gaseosa; además la composición superficial de la muestra debe permanecer sin variaciones durante su análisis.

Difracción de rayos X

La difracción de rayos X (DRX) es una técnica analítica no destructiva que permite analizar las fases cristalinas (cristalografía) de una muestra y su composición química (cualitativa y cuantitativa). Los rayos X son la radiación electromagnética, invisible, capaz de atravesar cuerpos opacos. Su longitud de onda se encuentra entre los 10 a 0.01 nm. Los rayos X surgen de fenómenos extra nucleares, a nivel de la órbita electrónica, principalmente producidos por desaceleraciones de electrones.

La difracción de rayos X es el resultado obtenido cuando un haz de rayos X con una determinada longitud de onda, incide en una sustancia cristalina. Cuando el haz de rayos X incide sobre un cristal, provocará que los átomos que conforman a éste dispersen a la onda incidente tal que cada uno de ellos produce un fenómeno de interferencia que para determinadas direcciones de incidencia será destructivo y para otras constructivo surgiendo así el fenómeno de difracción. De tal forma que la técnica se utiliza para determinar el arreglo de los átomos en los compuestos sólidos y para medir las longitudes y ángulos de enlace.

La información que proporciona el patrón de difracción de rayos X, se puede ver como dos aspectos diferentes pero complementarios: por un lado, la geometría de las direcciones de difracción (condicionadas por el tamaño y forma de la celdilla elemental del cristal) ofrecen información sobre el sistema cristalino. Y por otro lado la intensidad de los rayos difractados, están íntimamente relacionados con la naturaleza de los átomos y las posiciones que ocupan en la red, tal que su medida constituye la información tridimensional necesaria para conocer la estructura interna del cristal. Esto hace que cada sustancia cristalina presente su propio espectro de difracción y este sea una auténtica huella dactilar del mismo, permitiendo su identificación en cualquier mezcla donde esté presente (66). La dispersión de rayos X utiliza la Ley de Bragg para predecir la dirección en que se da la interferencia entre los haces de rayos X dispersados por el cristal, misma que se representa por la siguiente ecuación:

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

Donde d es la periodicidad de la estructura o en este caso, el espaciamiento interatómico (distancia entre los planos de la red cristalina); λ es la longitud de onda del haz incidente; θ es el ángulo de incidencia (entre los planos incidentes y los planos de dispersión), y n es el número entero (1,2,3...). La intensidad de los rayos X difractados se miden en función de la difracción del ángulo 2θ y la orientación de la muestra.

Existen tres métodos de difracción de rayos X: método de Laue, método de movimiento o rotación total o parcial del cristal, y por último el método del polvo. La difracción de rayos X de muestras en polvo es una técnica de caracterización básica de cualquier material con estructura cristalina (no amorfo) que genera una huella digital de la muestra y puede usarse para identificar el tamaño y forma de la celda unitaria midiendo el espacio entre las líneas del patrón de difracción mediante la ecuación de Bragg.

En la técnica de difracción de polvo, un haz monocromático (de una sola frecuencia) de rayos X se dirige a una muestra pulverizada dispersa en un soporte, y la intensidad de la difracción se mide a medida que el detector se mueve a diferentes ángulos. El difractómetro de polvo es un tubo sellado convencional con anticátodo de cobre. El haz es colimado por un juego de rendijas antes y después de incidir en la muestra. El barrido se realiza sincronizadamente θ - 2θ y el haz difractado es recogido por el detector cuando se alcanza la condición de Bragg. En la figura 9 se muestra un esquema básico del difractómetro de rayos X.

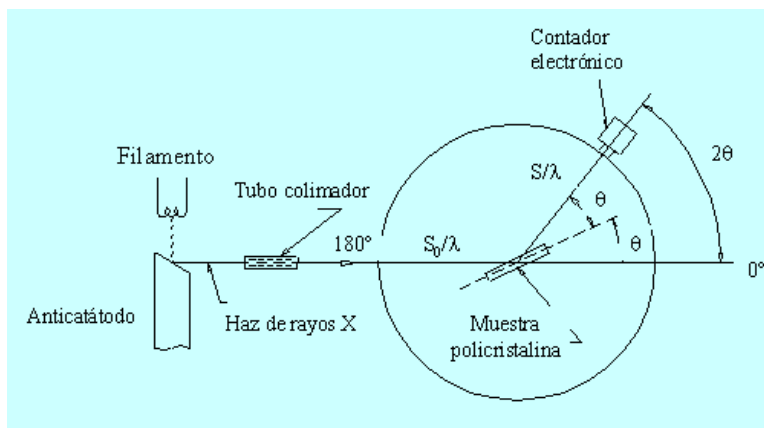


Figura 9. Esquema básico de un difractómetro de Rayos X.

Fuente: http://www.upv.es/materiales/Fcm/Fcm03/pfcm3_4_1.html

Para la caracterización de las muestras de los biomateriales por la técnica de difracción de rayos X se utilizó un difractómetro de polvos Bruker axs modelo D8 Advance, con radiación α_1

Cu (Cu $K\alpha_1$), por el método de polvos, de θ 10 a 70. En la figura 10 se muestra el procedimiento seguido para la preparación de las muestras y análisis por difracción de rayos X.

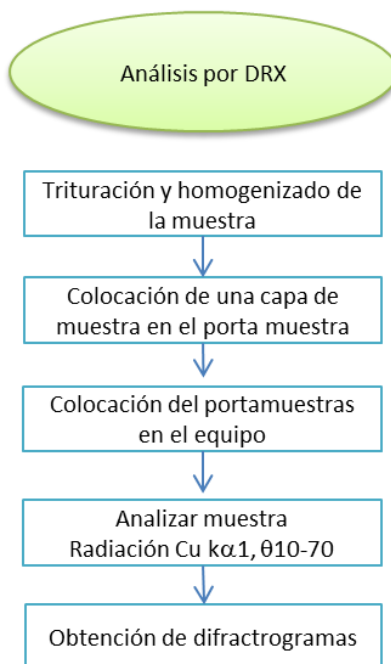


Figura 10. Procedimiento para el análisis por difracción de rayos X.

Microscopía electrónica

La microscopía electrónica es un conjunto de técnicas que se utilizan para caracterizar superficialmente un objeto. A diferencia del microscopio óptico, el microscopio electrónico utiliza electrones acelerados que permiten resoluciones atómicas (figura 11). Existen varios tipos de microscopía electrónica, entre ellos se identifican las siguientes: microscopía electrónica de transmisión (MET), microscopía electrónica de barrido (MEB), y microscopía de fuerza atómica (MFA). Para obtener una imagen por cada una de estas técnicas la superficie de la muestra se barre mediante un rastreo programado con un haz de electrones muy fino focalizado. En este rastreo programado, el haz de electrones barre la superficie en línea recta

(dirección x), vuelve a la posición inicial y es desplazado hacia abajo (dirección y); este proceso se repite hasta que el área deseada de la superficie ha sido barrida. Durante el proceso de barrido se recibe una señal por encima de la superficie (dirección z) y se almacena en un sistema computarizado donde posteriormente se convierte en imagen (62).

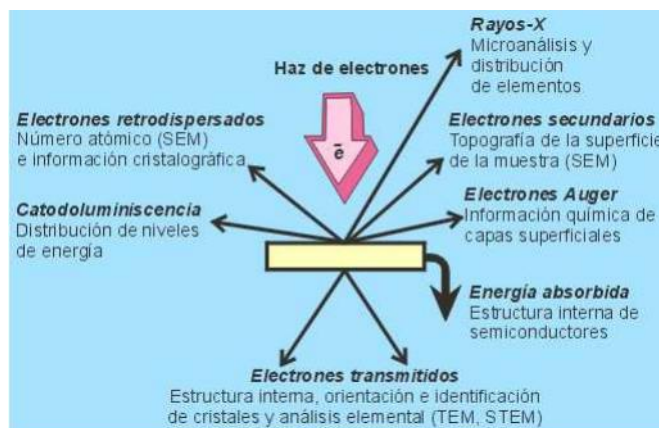


Figura 11. Esquema general del efecto del haz de electrones sobre una muestra dando lugar a los tipos de microscopía electrónica más importantes.

Fuente: http://ocw.um.es/gat/contenidos/ubero/microscopia/material_clase/Sesion_Teorico-04.pdf

Microscopía electrónica de barrido

El microscopio electrónico de barrido permite obtener imágenes ampliadas (reales) de las superficies de las muestras analizadas mediante la utilización de un haz de electrones de alta energía que realiza un rastreo programado de la superficie de la muestra (sólida), generando en ésta diversos tipos de señales. Estas señales incluyen electrones retrodispersados, secundarios y Auger. Las señales más utilizadas son las de los electrones retrodispersados y secundarios (62). El electrón retrodispersado es aquel que cambia su trayectoria al atravesar un átomo, mientras que el electrón secundario es aquel que surge del átomo al colisionar con él un electrón primario, que a su vez es retrodispersado. En la figura 12 se muestran los efectos básicos de los electrones al chocar con la materia. Cuanto mayor sea el número de electrones

contados por el dispositivo mayor será el brillo del pixel en la pantalla. A medida que el haz de electrones barre la muestra, se presenta toda la imagen en el monitor. Estos microscopios pueden ampliar los objetos 200,000 veces o más.

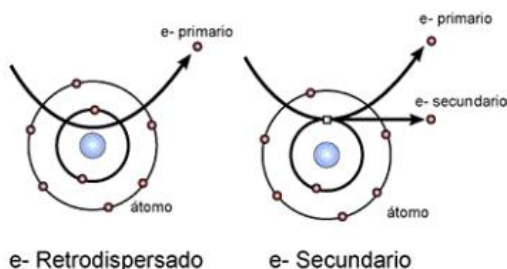


Figura 12. Electrones secundarios y retrodispersados.

Fuente: http://ocw.um.es/gat/contenidos/ubero/microscopia/material_clase/Sesion_Teorico-04.pdf

El microscopio electrónico de barrido se compone de un cañón de electrones, de un sistema de focalización de electrones y un detector de electrones. El barrido se lleva a cabo mediante dos pares de bobinas localizadas entre las lentes objetivo; uno de los pares desvía el haz de electrones acelerados en la dirección x a lo largo de la muestra y el otro lo desvía en la dirección y . El barrido se controla mediante aplicación de una señal eléctrica a uno de los pares de las bobinas de barrido, de manera que el haz de electrones alcanza la muestra a un lado del eje central del sistema de lentes. Variando en función del tiempo la señal eléctrica de este par de bobinas, el haz de electrones se mueve describiendo una línea recta a lo largo de la muestra y entonces vuelve a su posición inicial. Después de realizar este barrido lineal, se utiliza el otro par de bobinas para desviar el haz ligeramente y de nuevo se repite el movimiento del haz utilizando las bobinas x . Mediante estos movimientos rápidos del haz, la superficie de la muestra puede ser irradiada completamente con el haz de electrones. Las señales que llegan a las bobinas de barrido pueden ser analógicas o digitales. Los barridos digitales tienen la ventaja de que ofrecen un movimiento y una localización muy reproducible del haz de electrones. La señal de la muestra puede ser codificada y almacenada en forma digital junto con las

representaciones digitales de las posiciones x e y del haz (62). El método de barrido produce un mapa de la muestra que representará las características morfológicas de la misma. En la figura 13 se muestra un esquema de un microscopio electrónico de barrido.

El microscopio electrónico de barrido proporciona información morfológica y topográfica sobre la superficie de los sólidos.

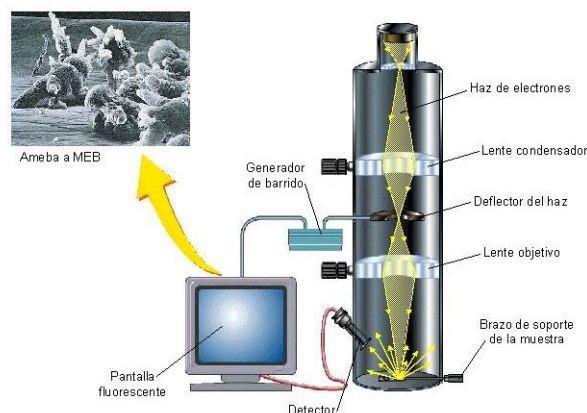


Figura 13. Diagrama del microscopio electrónico de barrido
Fuente: <https://sites.google.com/site/lacelulaunidadfundamental/microscopio>

Las cámaras de muestra en un microscopio electrónico de barrido están diseñadas para permitir cambios rápidos de muestras y para ello, se utilizan bombas de vacío de alta capacidad. El soporte de la muestra, o portaobjetos, es capaz de sujetar, por el borde, muestras de varios centímetros y puede moverse en las direcciones x , y , y z , y rotar alrededor de cada uno de los ejes lo que genera que las superficies de las muestras se puedan observar casi desde cualquier perspectiva.

Las muestras que conducen la electricidad son las más fáciles de estudiar, ya que la libre circulación de los electrones a tierra permite minimizar problemas asociados con la acumulación de carga. Las muestras que son buenas conductoras de la electricidad son buenas conductoras del calor, lo que probablemente minimiza su degradación térmica. La

mayor parte de las muestras biológicas y muchas muestras minerales no son conductoras por lo que se tienen que preparar para poder generar imágenes por MEB. Las técnicas más comunes son el recubrimiento de la superficie de la muestra con una película metálica delgada producida por evaporación bombardeo o por evaporación al vacío.

Para el análisis de microscopía electrónica de barrido de las muestras de las tres formulaciones preparadas se utilizó un microscopio JEOL JSM 7600F de emisión de campo. En la figura 14 se muestra el procedimiento seguido para la preparación de las muestras y análisis por microscopía electrónica de barrido.

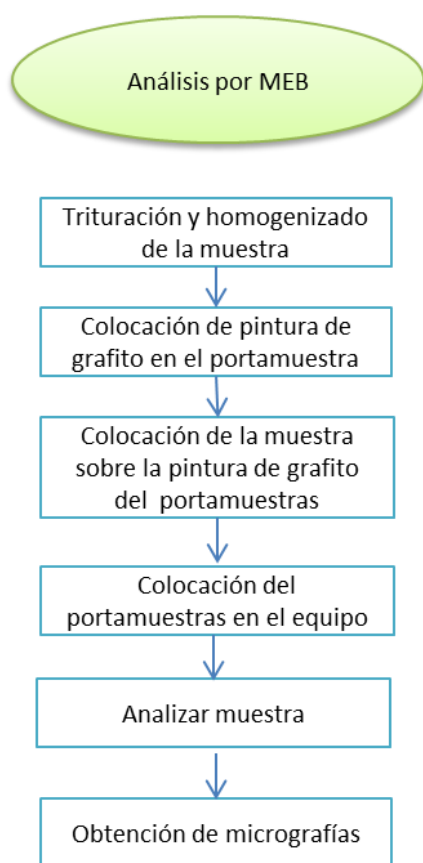


Figura 14. Procedimiento para el análisis por microscopía electrónica de barrido

Microscopía de fuerza atómica

La microscopia de fuerza atómica (MFA) es una técnica de imagen y caracterización de superficie descrita por Bining y *col.*, como una técnica para generar imágenes en alta resolución de la topografía de la superficie de una muestra (67), sin destruirla y sin la necesidad de realizar preparaciones especiales con la misma.

Este tipo de microscopía se basa en la interacción local entre la punta de un cantilever y la superficie de una muestra a través de las fuerzas repulsivas y de atracción (fuerzas de van der Waals) que existen entre la punta y la superficie de la muestra proporcionando una imagen topográfica tridimensional de la misma (67). Esta técnica permite ver y medir la superficie estructural de una muestra, permite obtener imágenes que muestran el arreglo de los átomos individuales en una muestra, o ver la estructura de moléculas individuales (68).

La instrumentación básica de AFM consta de: transductor piezoeléctrico, transductor de fuerza y control electrónico. El transductor piezoeléctrico mueve la punta sobre la superficie de la muestra; el transductor de fuerza percibe la fuerza entre la punta del cantilever y la superficie; y el control electrónico retroalimenta la señal del transductor de fuerza en el transductor piezoeléctrico para mantener una fuerza fija entre la punta de la sonda y la muestra. En la Figura 15 se muestra un esquema general de los componentes de un microscopio de fuerza atómica.

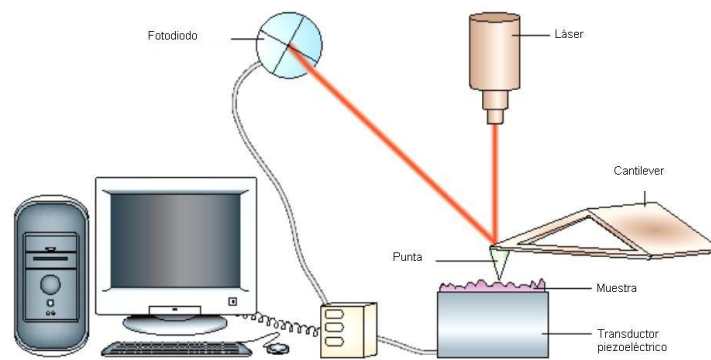


Figura 15. Representación esquemática de los componentes de un microscopio de fuerza atómica.

El instrumento tiene una punta filosa con un radio de curvatura de 20 a 60 nm montada en el extremo de un cantilever flexible. La punta recorre la superficie de interés y simultáneamente monitorea la deflexión del brazo conforme recorre la muestra generando un mapa con las características topográficas de la superficie a alta resolución (67). La fuerza interatómica que contribuye a la deflexión del cantilever es la fuerza de Van der Waals.

Existen diferentes formas para realizar la técnica dependiendo de las propiedades de la muestra. Hay técnicas estáticas y dinámicas, las primeras incluyen el modo contacto en donde la punta de la sonda permanece en constante contacto con la muestra, y las segundas, en donde el cantilever oscila, incluyen el modo intermitente (tapping) y en modo de no contacto. A continuación se describen brevemente:

- Contacto: el cantilever se mantiene a pocos angstroms de la superficie de la muestra y la fuerza entre el cantilever y la muestra es repulsiva, mide la topografía de la muestra deslizando la punta sobre su superficie.
- Tapping: o contacto intermitente, el cantilever oscila midiendo la topografía de la muestra tocando intermitentemente su superficie.

-
- Imagen de fase: proporciona una imagen contrastada generada por las diferencias de adhesión en la superficie de la muestra.
 - No contacto: el cantilever se mantiene a decenas de angstroms de la superficie de la muestra y la fuerza interatómica entre la punta y la muestra es atractiva, mide la topografía de acuerdo a las fuerzas de Van der Waals que existen entre la superficie de la muestra y la punta.

La técnica de AFM es considerada una de las más importantes herramientas en la nanotecnología, además se utiliza para el análisis de muestras biológicas.

Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (MET) da imágenes por medio de electrones que atraviesan la muestra como lo hace la luz en el microscopio óptico. La relevancia de la caracterización por medio de esta técnica radica en su capacidad de determinar la morfología, tamaño y estructura cristalina de materiales en los niveles micrométrico, nanométrico y atómico (hasta 0.85 Å), para posteriormente correlacionarla con sus propiedades fisicoquímicas, ópticas, magnéticas y electrónicas en el nivel macroscópico (63). El microscopio electrónico de transmisión es un instrumento que aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerado colisiona con una muestra (en cortes ultrafinos) (63, 69).

Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, hay una gradación entre los electrones que la atraviesan directamente y los que son totalmente desviados. Todos

ellos son conducidos y modulados por unas lentes para formar una imagen final sobre una pantalla (63, 69). Se coloca una placa fotográfica o una pantalla fluorescente detrás del objeto para registrar la imagen aumentada. La información que se obtiene es una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes (63). En la figura 16 se muestra un esquema genérico sobre la obtención de imagen a través del MET.

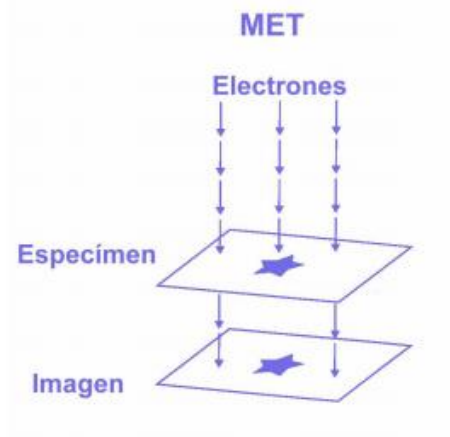


Figura 16. Esquema básico de la obtención de la imagen en un MET.

Fuente: http://ocw.um.es/gat/contenidos/ubero/microscopia/material_clase/Sesion_Teorico-04.pdf

Las partes principales de un microscopio electrónico de transmisión son: cañón de electrones (filamento de tungsteno o hexaboruro de lantano), lentes magnéticas, sistema de vacío, placa fotográfica o pantallas fluorescente y sistema de registro. En la figura 17 se muestra un esquema general de este tipo de microscopio.

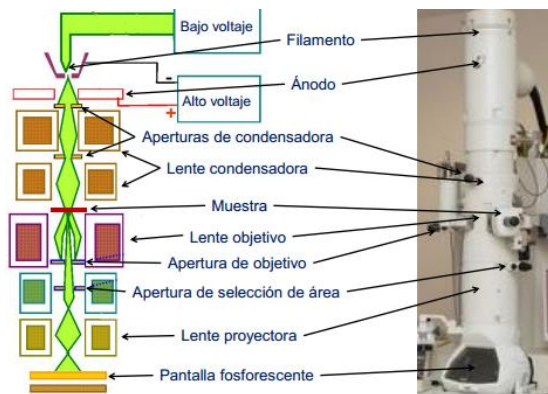


Figura 17. Componentes del Microscopio electrónico de transmisión.

Fuente: <http://ssyf.ua.es/es/formacion/documentos/cursos-programados/2012/especifica/tecnicas-instrumentales-en-el-analisis-de-superficie/tem-sesion-12-noviembre.pdf>

La imagen del MET ofrece información sobre la estructura de la muestra, tanto si esta es amorfa o cristalina. Si la muestra es cristalina, es decir, hay una estructura de planos periódica, puede ocurrir que varias familias de esos planos cumplan la condición de Bragg y difracten de forma coherente la onda electrónica incidente, dando lugar a un diagrama de difracción, que es una imagen de distintos puntos ordenados respecto a un punto central (electrones transmitidos no desviados) que aportan información sobre la orientación y estructura del(os) cristal(es) presente(s) (63).

La estructura cristalina es una característica muy importante en nanotecnología ya que es esencial para controlar las características del material. El patrón de difracción que se obtiene mediante la técnica TEM proporciona información sobre la estructura cristalina de la muestra, la distancia repetida del enrejado y la forma del espécimen. La formación cristalográfica del patrón de difracción está relacionada con la imagen de la muestra. Las imágenes TEM son en 2D, no tienen sensibilidad de profundidad.

Las muestras que se analizan por medio de esta técnica deben ser muy delgadas (<150 nm). Comúnmente se utilizan unas mallas o rejillas como soporte. Cuando las muestras son polvos

finos, éstas se suspenden en un disolvente volátil y se depositan en una rejilla como se muestra en la siguiente figura.

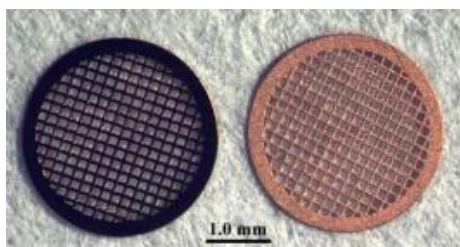


Figura 18. Rejillas utilizadas para la colocación de muestras en un MET.

El diagrama de difracción de una muestra es un reflejo de su organización estructural a nivel atómico y molecular. Para una sustancia amorfa, el diagrama consiste en un halo difuso que rodea a una mancha central interna correspondiente a la radiación no desviada. Este es el caso de la mayor parte de las muestras biológicas, los materiales vítreos y las películas metálicas que se obtienen por evaporación. La información que suministra esta clase de diagrama es escasa y de difícil interpretación. Las sustancias cristalinas originan diagramas constituidos por máximos y mínimos discretos cuya localización viene definida por el tipo de estructura presente. Es solo en este caso cuando la técnica de difracción presenta interés.

El modelo de diagrama que se obtiene de una muestra cristalina está determinado por el tipo y grado de orientación molecular que en ella existe. Cuando se trata de un monocristal, el diagrama consiste en un retículo puntual que refleja la red del mismo en el plano perpendicular al haz electrónico. Inclinando el cristal a diferentes ángulos mediante un giniómetro se obtienen diagramas que corresponden a otros planos reticulares y es posible recabar la información necesaria como para determinar todos los parámetros de la estructura cristalina. Las muestras policristalinas en cambio dan diagramas consistentes en anillos, los cuales están integrados por las reflexiones que corresponden a las ilimitadas orientaciones que adoptan los múltiples

dominios monocristalinos. En la figura 19 se muestra una serie de imágenes correspondientes a patrones de difracción obtenidos por MET para muestras cristalinas, policristalinas y amorfas. La información básica presente en el diagrama de difracción viene dada por la posición y la intensidad relativa de las reflexiones. En la difracción de rayos X ambos tipos de datos son frecuentemente utilizados en la determinación de la estructura.

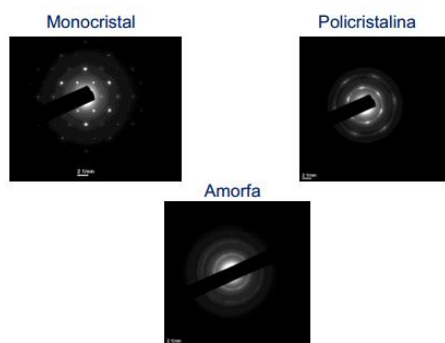


Figura 19. Patrones de difracción característicos de muestras cristalinas, policristalinas y amorfas

En la difracción de electrones la interpretación de la intensidad es más complicada dada la fuerte interacción con la materia que ocurre en este caso, ello hace que los datos de intensidad se suelen valorar solo de manera cualitativa y aproximada.

La posición de las reflexiones por otra parte define las distancias interplanares presentes en la red cristalina y su determinación se realiza en base a la ley de Bragg. La difracción de rayos X y la de electrones tienen como objetivo el análisis estructural de muestras. La difracción electrónica genera un efecto destructivo sobre la muestra ejercida por el haz de electrones, sobre todo en muestras orgánicas (70).

FASE III: ENSAYOS DE BIOCOMPATIBILIDAD

El procedimiento para la evaluación de la biocompatibilidad *in vivo* de los materiales de hidroxiapatita se realizó en diferentes etapas utilizando ratas Wistar. La primera y segunda etapa se realizaron en el animalario de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California; estas etapas incluyeron la colocación (implante) de las pastillas de los materiales en las ratas y posteriormente se tomó una muestra de tejido que estuvo en contacto con la pastilla para su posterior evaluación histológica. La tercera etapa se realizó en el Laboratorio de Histopatología del Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California (CISALUD), esta etapa consistió en la preparación del tejido para su observación y evaluación histológica.

En la primera etapa de esta fase se formaron grupos experimentales y de control a partir de un total de 42 ratas Wistar (hembras adultas). Se dividieron en 12 grupos de 3 ratas cada uno, para ser evaluados 3 grupos (uno por cada material de hidroxiapatita- HA, HA-F y HA-Ag-F) en cada tiempo de estudio (7, 14, 30 y 90 días) y se formaron 3 grupos control de 2 ratas cada uno.

A cada rata se le colocó una pastilla del material de hidroxiapatita en dos sitios, a nivel subdérmico en el lomo, y a nivel intramuscular en el muslo de la extremidad inferior derecha. De esta forma se obtuvieron al final de cada periodo de estudio dos muestras de tejido por cada rata.

A las ratas del grupo control se les colocó un trozo de gasa estéril en los mismos sitios.

Una vez formados e identificados los grupos por material y tiempo de observación, se procedió a anestesiarse a las ratas con CCl₄ (cloroformo), anestesiado el animal, se rasuró el área del dorso y una vez eliminado el pelaje se realizó asepsia con solución esterilizante y antiséptica de superoxidación (Microdacyn 60 ®) en el lugar en donde se colocará el material de

hidroxiapatita y en el muslo de la extremidad inferior derecha. Después de limpiadas las áreas se realizó una incisión en la piel y se debridó el área para colocar una pastilla de material de aproximadamente de 3.0 mm², se cerró con un punto de sutura quirúrgica; a nivel intramuscular se realizó una incisión en el muslo derecho y se llegó hasta el músculo, se separó el tejido muscular con una pinza de disección y se colocó una pastilla del material entre las fibras, se cerró colocando un punto de sutura por fuera. Al grupo control se le realizó el mismo procedimiento tanto en el dorso como en el muslo, solo que se les colocó gasa estéril en lugar del material de hidroxiapatita. Se mantuvo en observación a las ratas y a los 7, 14, 30 y 90 días se sacrificaron los animales pertenecientes a cada grupo mediante una inhalación de cloroformo. Se obtuvieron muestras de tejido subcutáneo e intramuscular de los lugares en donde se colocó el material, éstas se colocaron dentro de tubos de ensayo con formalina al 10% para su fijación durante un periodo mínimo de 24 horas. En la figura 20 se muestra el diagrama de flujo.

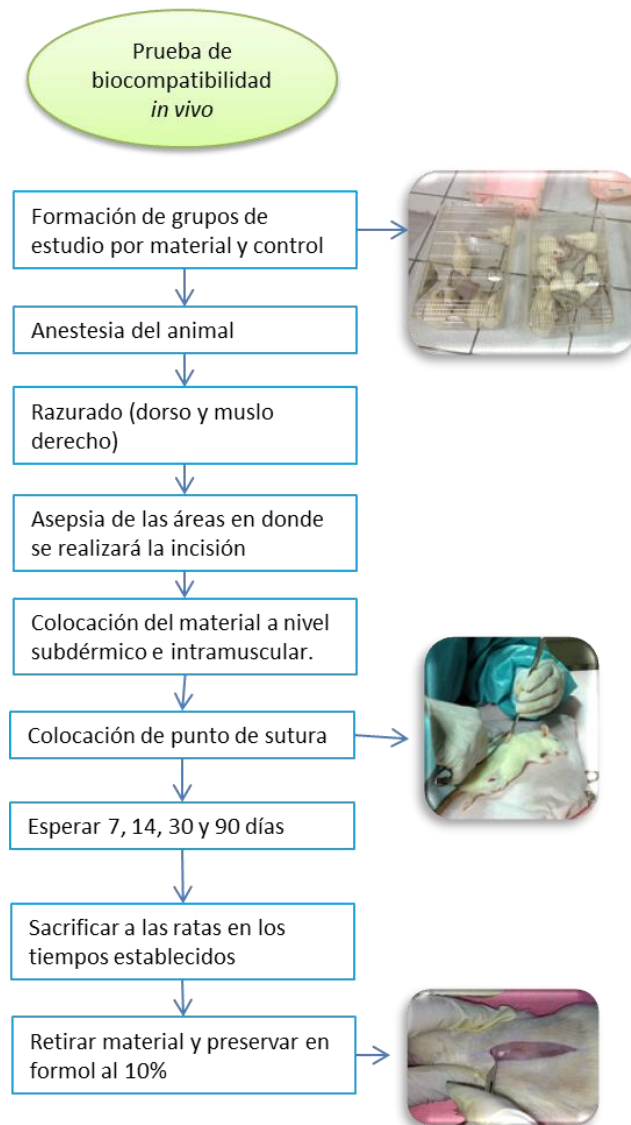


Figura 20. Procedimiento para estudio de biocompatibilidad in vivo en ratas hembras Wistar.

Las muestras se llevaron al Laboratorio de Histopatología de Centro de Ciencias de la Salud, Unidad Valle de las Palmas, de la Universidad Autónoma de Baja California, para su preparación y posterior observación al microscopio. La preparación consistió deshidratar y embeber las muestras de tejido en parafina y cortarlas en láminas de 2 micrómetros para ser teñidas con la técnica de tinción de hematoxilina y eosina, para posteriormente observar al microscopio de luz tomando en cuenta los parámetros de inflamación descritos en la tabla 2.

El procesamiento consistió en colocar la muestra de tejido en el procesador de tejidos Histokinette de Thermo Scientific programado para una rutina de 12 horas con la siguiente secuencia: sumergir 2 horas en formol amortiguado con fosfatos, después sumergir 2 horas en alcohol de 96°, 2 horas en alcohol absoluto, 3 horas en xilol y 2 horas en parafina; en todos los baños se realizó una agitación horizontal convencional y vertical por 30 segundos.

El siguiente paso fue colocar el tejido en el inclusor, Tissue Embedding Center, marca TBS, para hacer los bloques de parafina que incluyen la muestra de tejido. Estos bloques se cortaron en láminas de 2 milímetros y se colocaron en un portaobjetos. Después se inició la desparafinización con calor y se continuó con dos baños de xilol. Se realizó la tinción con hematoxilina y eosina y se montaron con resina y cubreobjetos #1, para finalmente ser observados bajo el microscopio.

Los resultados de las observaciones se utilizaron para elaborar una base de datos misma que fue analizada utilizando el programa IBM SPSS Statistics 20. Por el tipo de variables generadas, se realizó un análisis estadístico descriptivo, para cada uno de los biomateriales analizados en los diferentes tiempos.

6. RESULTADOS

Caracterización fisicoquímica

Una vez obtenidas las muestras de los tres diferentes sistemas a partir del método de combustión, estas se caracterizaron fisicoquímicamente a partir de diversas técnicas espectroscópicas y microscópicas.

Primeramente se caracterizaron a partir de la técnica de **Espectroscopía Infrarroja (IR)** a fin de identificar los grupos funcionales presentes en cada una de las muestras; esto se realizó comparando las señales registradas en el espectro con las reportadas en la literatura para cada una de las bandas pertenecientes a los grupos funcionales que de manera regular se presentan en compuestos a base de hidroxiapatita.

En la figura 21 se muestran los espectros IR obtenidos de las preparaciones de hidroxiapatita, hidroxiapatita con flúor e hidroxiapatita con plata y flúor, todas con tratamiento térmico a 600°C.

En el espectro IR de la hidroxiapatita se aprecian señales a 573 cm^{-1} y entre $900 - 1200\text{ cm}^{-1}$ que corresponden a los enlaces del grupo PO_4^{3-} (71), a 1042 cm^{-1} las señales se atribuyen a la presencia $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (72), la banda ancha en la región comprendida entre $2500-3700\text{ cm}^{-1}$ corresponde a H-O-H.

En lo que se refiere al espectro de la hidroxiapatita dopada con flúor se pueden apreciar señales a 3390 cm^{-1} asociadas a enlaces OH-F (73), de igual forma varias señales en la región comprendida de 946 a 1200 cm^{-1} se asocian a enlaces del grupo PO_4^{3-} (74-76) una señal un poco desplazada a la derecha en la región de 600 cm^{-1} que puede asociarse a la presencia de $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ (72), finalmente se observa una señal débil a 1456 cm^{-1} asociada a la presencia de enlaces CO_3^{2-} (75).

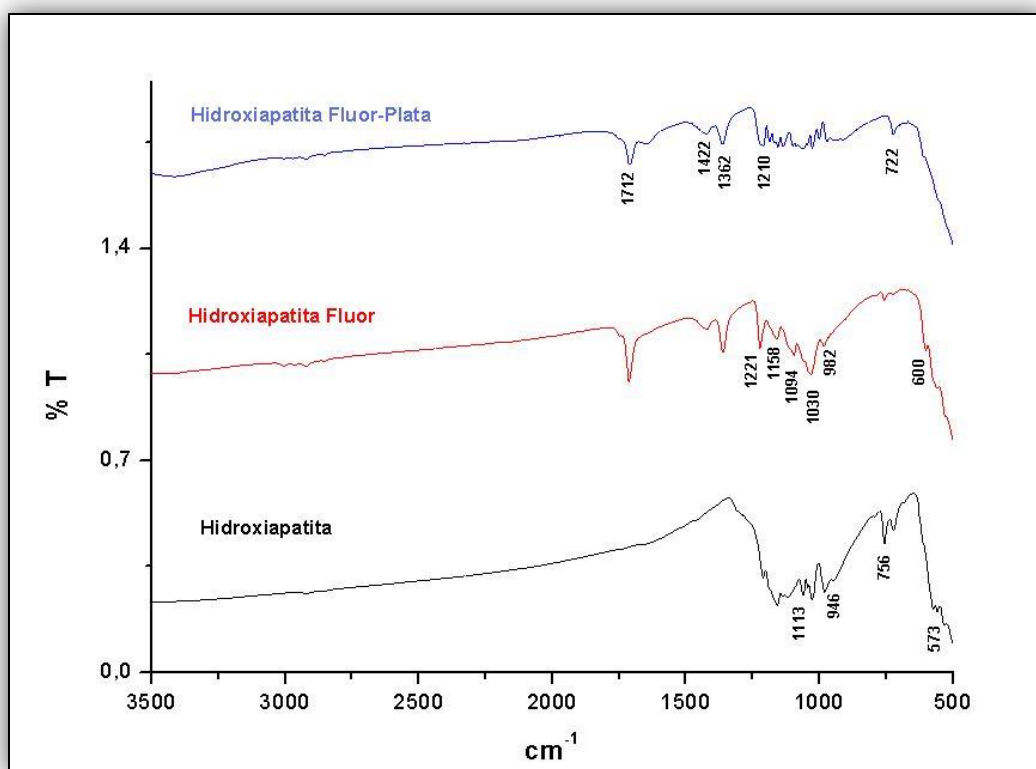


Figura 21. IR de la muestra de hidroxiapatita (HA).

En el IR de la hidroxiapatita dopada con plata y flúor se pueden apreciar señales entre 900-1200 cm^{-1} asociadas a la presencia de enlaces PO_4^{2-} , en la región de 1362 cm^{-1} se observa una señal asociada a AgNO_3 , además a 722 y 3400 cm^{-1} se observan señales asociadas a enlaces OH-F.

Utilizando la técnica de **espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)** se analizó la superficie de las muestras preparadas. Los picos observados para la formulación de hidroxiapatita dopada con plata y flúor (HA-Ag-F) muestran que el estado de oxidación para la plata es en su estado iónico (Ag^+). La región de 368-380 eV presenta un doblete del fotoelectrón de Ag 3d⁵ y Ag 3d³. Se observa otro doblete alrededor de la región de 350 eV que se relaciona con el pico de Ca 2p siendo este más intenso en la región de 445 eV (Ca 2s). En la región de 350.67 eV se observa una señal de Ca (2p) compuesta de dos líneas Ca 2p_{1/2}

asociado a apatita de calcio y Ca 2p 3/2 asociado a enlaces Ca-O. En la región de ~ 125 eV se observa una señal de P 2p que indica la presencia de fósforo derivado del grupo fosfato (PO_4^{3-}). Se observa un pico débil en la región 710 eV que corresponde a F 1s. En la figura 22, se muestran los diagramas obtenidos para cada una de las formulaciones analizadas. En las figuras 23 y 24 se muestran los detalles de identificación de flúor (F) y plata (Ag).

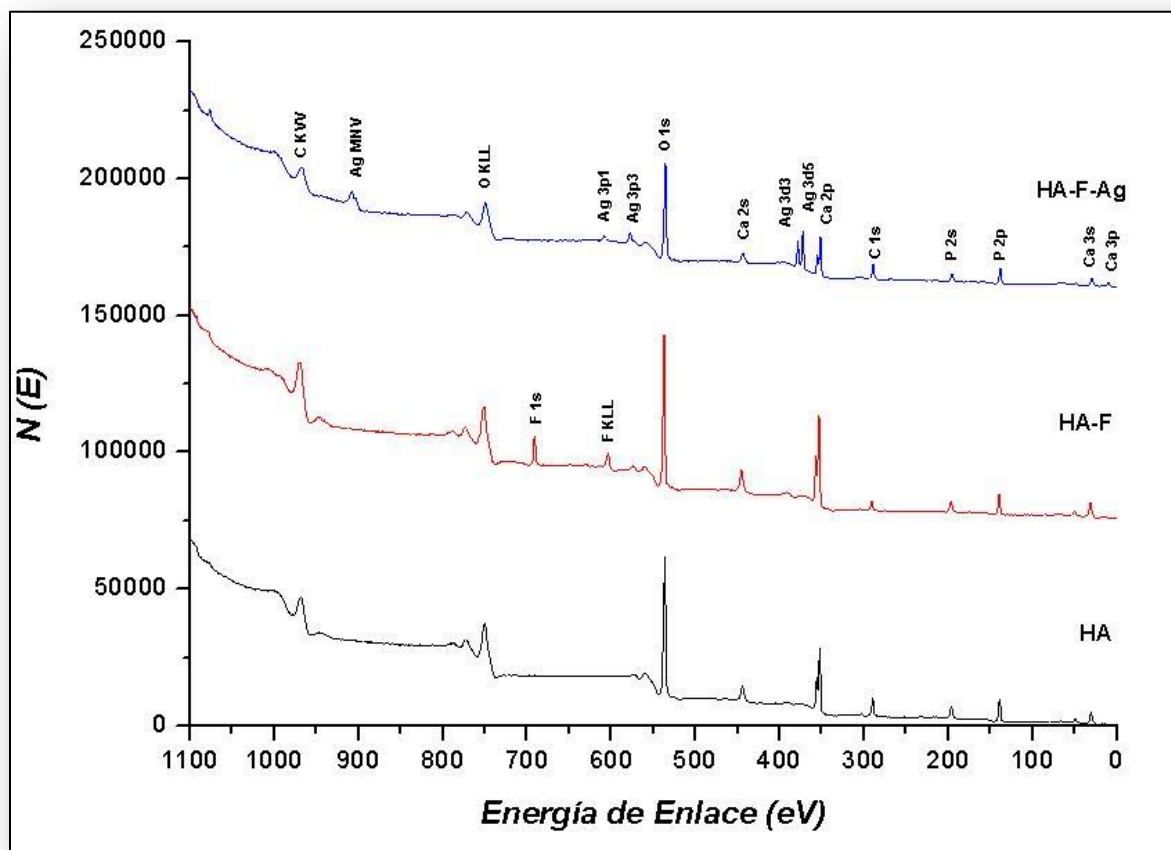


Figura 22. Análisis por XPS para las muestras de hidroxiapatita, hidroxiapatita dopada con flúor e hidroxiapatita dopada con plata y flúor, todas a 600°C.

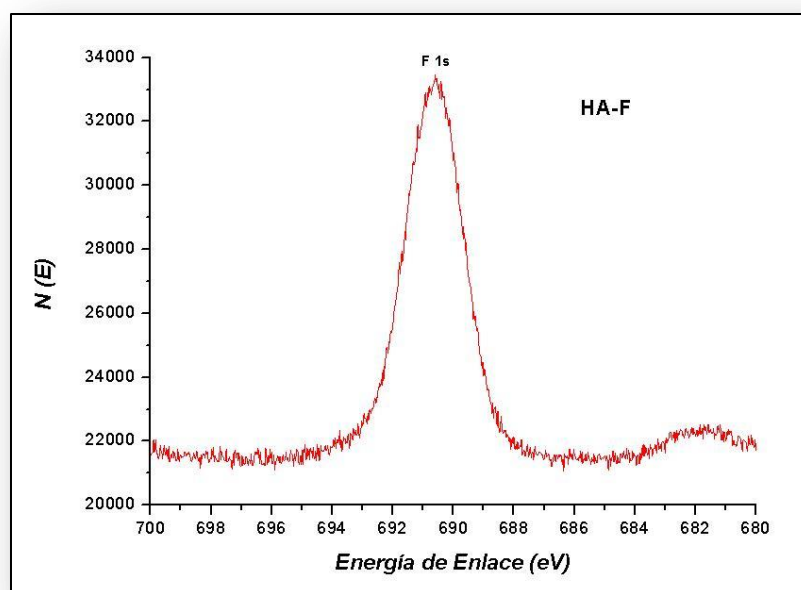


Figura 23. Detalle de la presencia de flúor (F) en la muestra de hidroxiapatita dopada con flúor, por XPS.

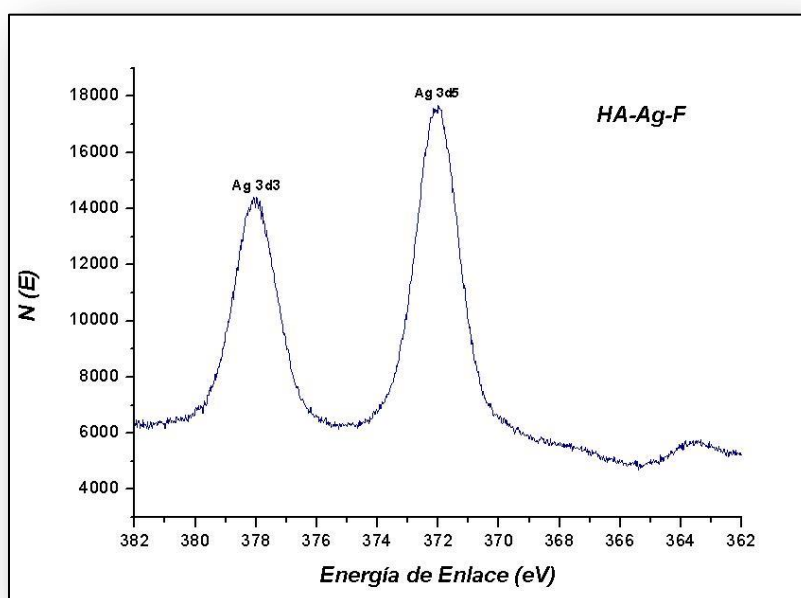


Figura 24. Detalle de la presencia de plata (Ag) en la muestra de hidroxiapatita dopada con plata y flúor, por XPS.

El análisis a través de la técnica de **difracción de rayos X (DRX)** de la formulación de hidroxiapatita con tratamiento térmico a 600°C y 900°C identificó la presencia de cristales de hidroxiapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$, y de fosfato de calcio en su formas $\alpha\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ y $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$. En la formulación de hidroxiapatita con flúor con tratamiento térmico a 600°C se identificó la presencia de cristales de fluoroapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}]$, fosfato de calcio $[\alpha\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7]$ y fluorita $[\text{CaF}_2]$. En la formulación de hidroxiapatita dopada con plata y flúor con tratamiento térmico a 600°C se identificó la presencia de cristales de fosfato de calcio $[\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7]$ y fosfato de plata $[\text{Ag}_3\text{PO}_4]$. En las figuras 25, 26 y 27 se muestran los difractogramas obtenidos para estas formulaciones.

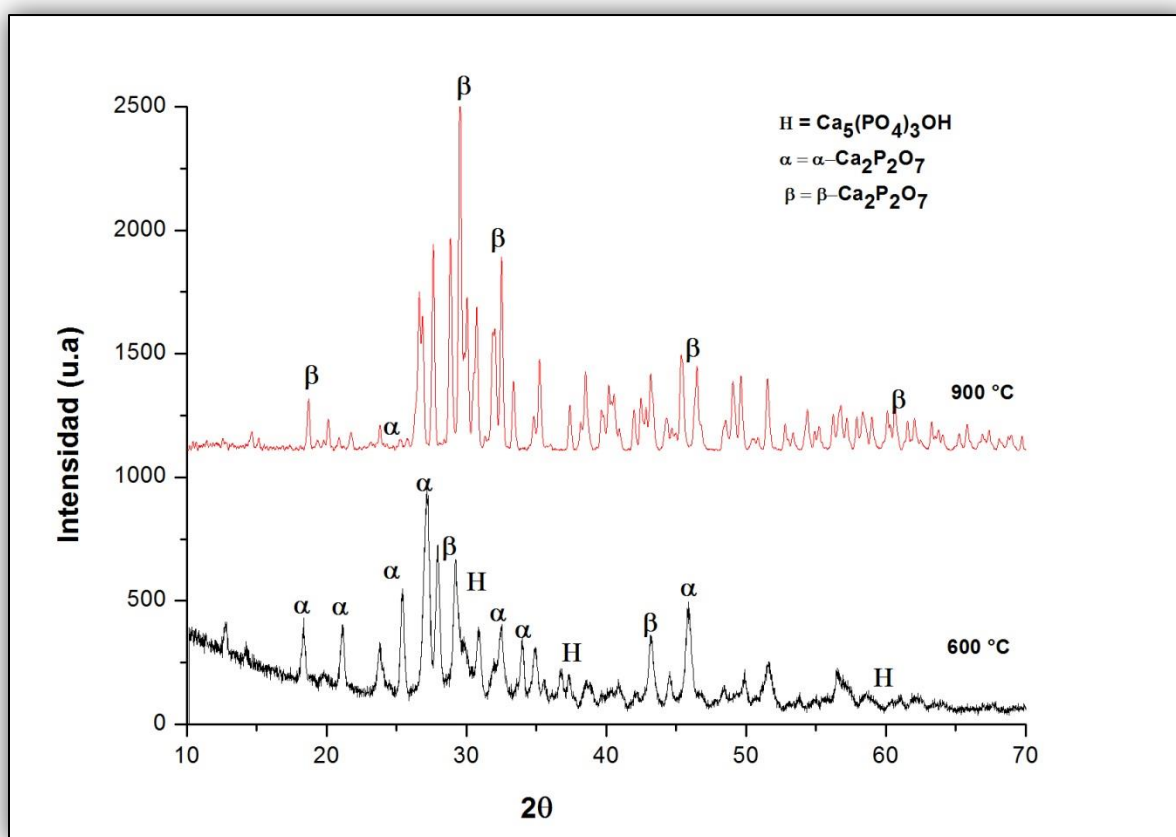


Figura 25. Difractograma de Rayos X para la formulación de hidroxiapatita.

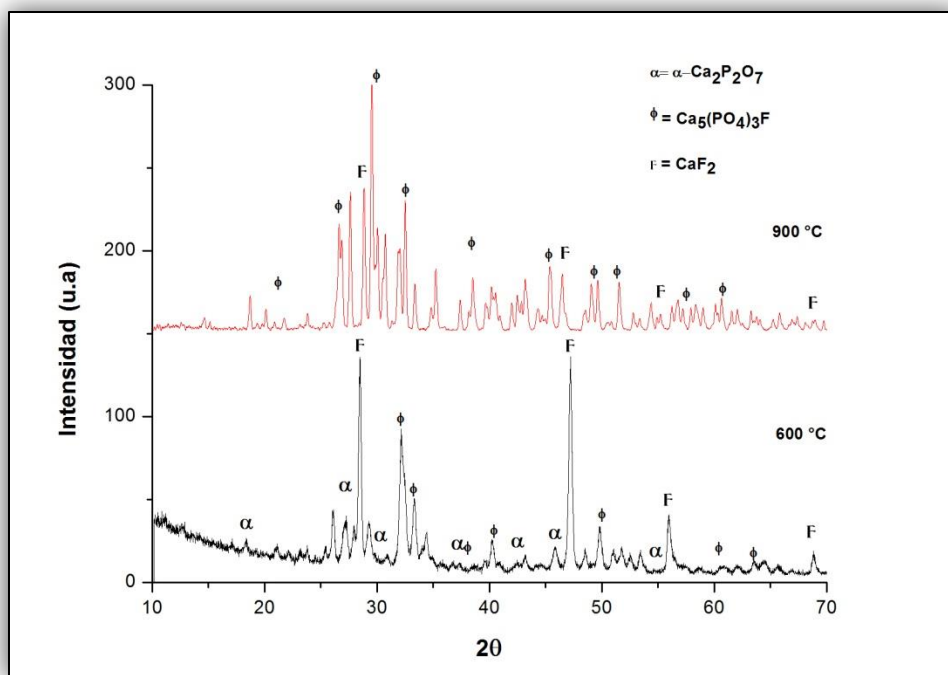


Figura 26. Difractograma de rayos X de la formulación de Hidroxiapatita con flúor.

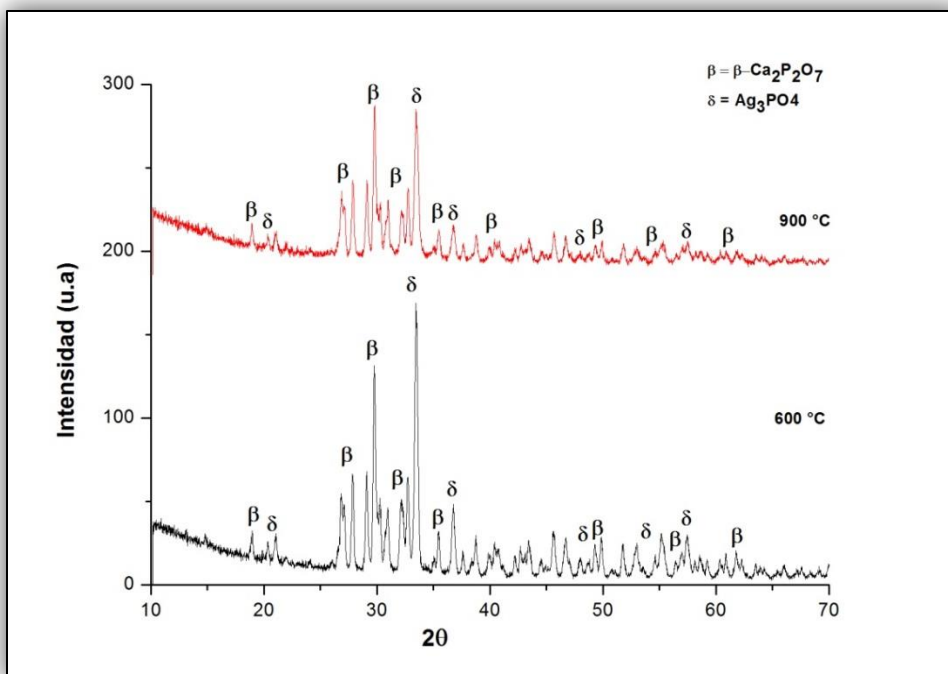


Figura 27. Difractograma de rayos X de la formulación de Hidroxiapatita con plata y flúor.

Las imágenes por **microscopía electrónica de barrido** (MEB) muestran las formas de cristalización que cada una de las tres formulaciones presentó. En la figura 28 se presenta una micrografía de la muestra de hidroxiapatita con tratamiento térmico a 600°C en donde se puede apreciar un agregado esférico con aparente cristalización, atribuido a partículas que presenta una ligera superficie plano-paralela.

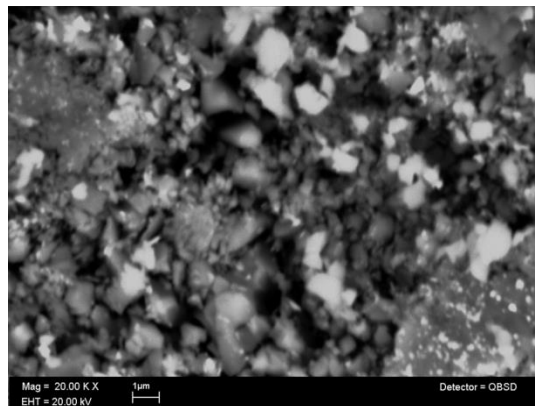


Figura 28. Imagen obtenida por MEB para la muestra de hidroxiapatita (600°C)

En la figura 29 se muestran las micrografías obtenidas al analizar la formulación de hidroxiapatita con flúor (fluoroapatita) con tratamiento térmico a 600°C en donde se observa un agregado uniforme con cúmulos esféricos.

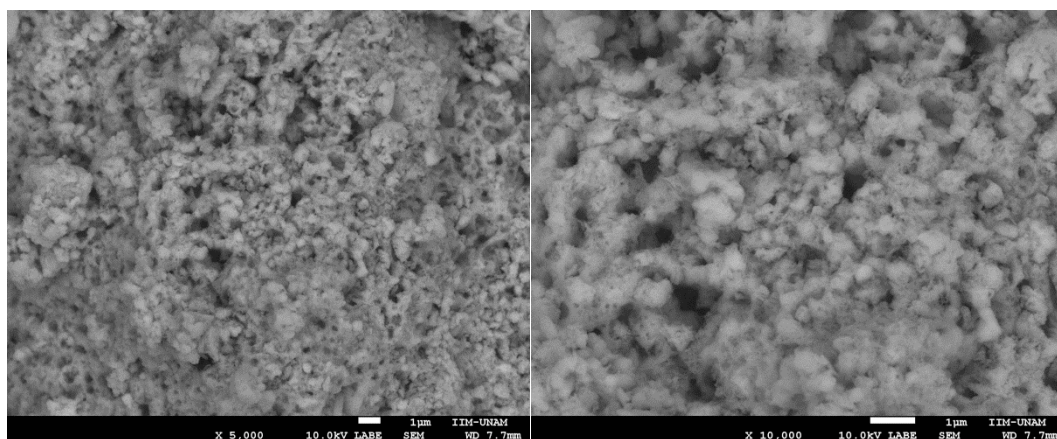


Figura 29. Imagen obtenida por MEB de la muestra de hidroxiapatita con flúor (600°C).

En la figura 30 se muestran unas microfotografías en donde se pueden apreciar de manera más definida los cristales de hidroxiapatita con flúor sinterizados. Las partes más claras corresponden a los sitios donde se concentró el flúor y se de igual forma se observa que se obtuvieron partículas con escala nanométrica. En el círculo se indican los cristales encontrados.

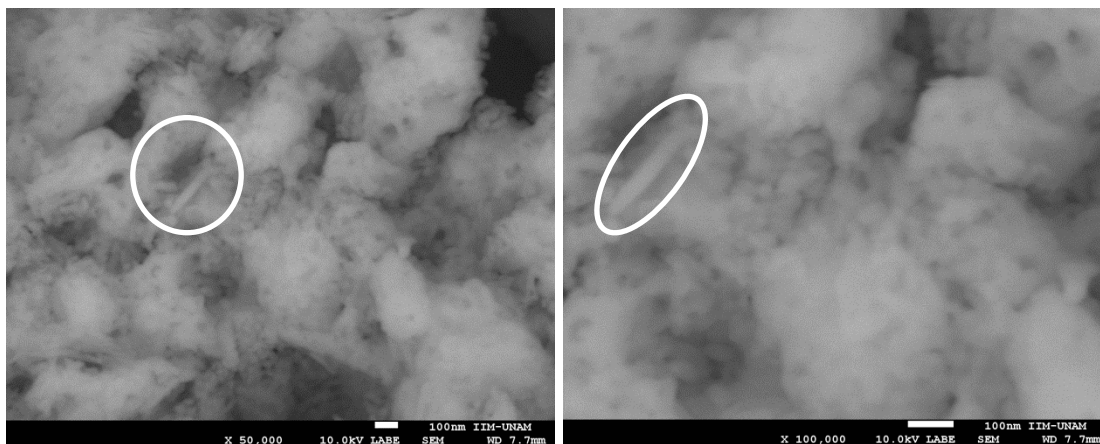


Figura 30. Imagen obtenida por MEB de la muestra de hidroxiapatita con flúor (600°C) donde se aprecia la formación de cristales.

El análisis por microscopía electrónica de barrido para el material de hidroxiapatita dopada con plata y flúor a 600°C muestra la formación de cristales definidos de formas predominantemente rectangulares y cuadrangulares, se observan también zonas blancas que corresponden a elementos metálicos, en este caso a la plata. En la figura 31 se muestran dos microfotografías que permiten apreciar de manera clara los cristales generados.

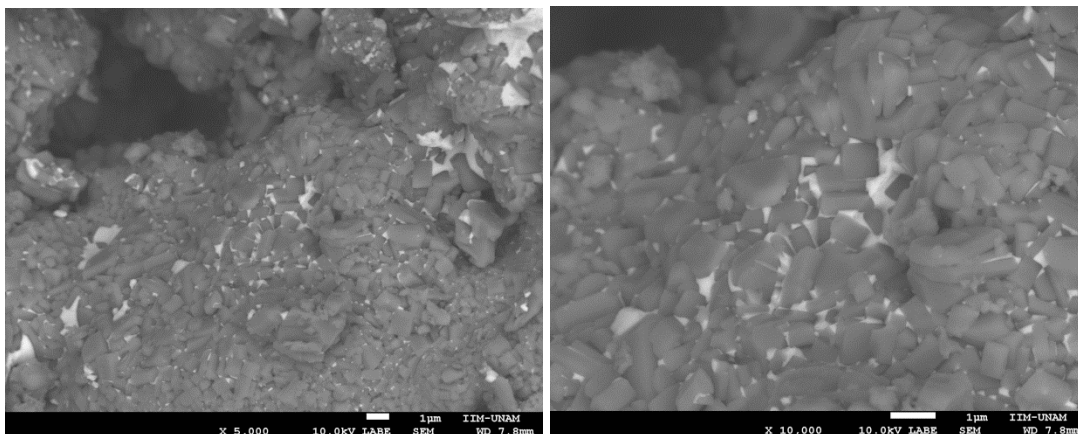


Figura 31. Microscopía electrónica de barrido del material de Hidroxiapatita con plata y flúor

En la figura 32 se muestra una microfotografía de este material con un aumento de 25,000 que permite claramente apreciar la formación del cristal.

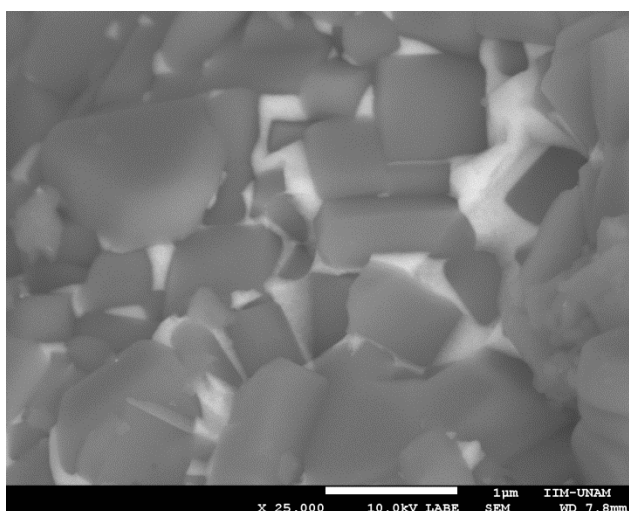


Figura 32. Apreciación de los cristales obtenidos en la muestra del material de hidroxiapatita con plata y flúor (600°C) con un aumento de 25,000.

Para la evaluación de las características morfológicas de los materiales preparados, se utilizó la técnica de **microscopía de fuerza atómica** (MFA), en cada una de las muestras preparadas tratadas a 600°C. Para la muestra de hidroxiapatita, primero se realizó un barrido en modo de contacto de 2.5 x 2.5 µm, donde se puede observar un material con formación granular, posteriormente se hizo un barrido de 1.07 x 1.07 µm en donde se aprecia la formación de una

mezcla de partículas esféricas, y finalmente se realizó un barrido de 507 x 507 nm; en la figura 33 se muestran microfotografías del material de hidroxiapatita que van desde 1 micrómetro de aumento hasta 200 nanómetros, en donde se puede apreciar perfectamente la frontera de grano de las partículas y a su vez, a mayor acercamiento (200 nm) la cementación de determinado número de nanopartículas.

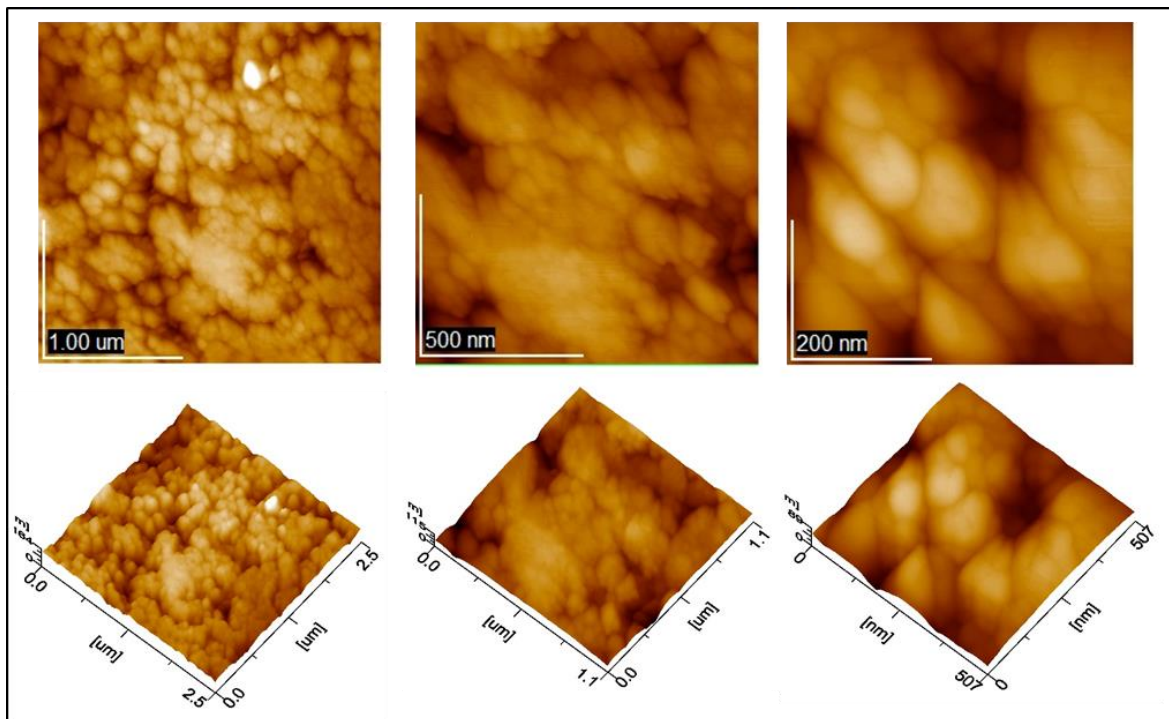


Figura 33. Microfotografía AFM del material de Hidroxiapatita a 600°C.

También se logró obtener un diagrama donde se puede, por tratamiento de programa de cómputo, apreciar el tamaño de partícula de la muestra. En el acercamiento a 500 nm se observa que el tamaño de partícula se encuentra entre 3.04 y 40.8 nm. En la figura 34 se presenta el respectivo análisis a diferentes aumentos.

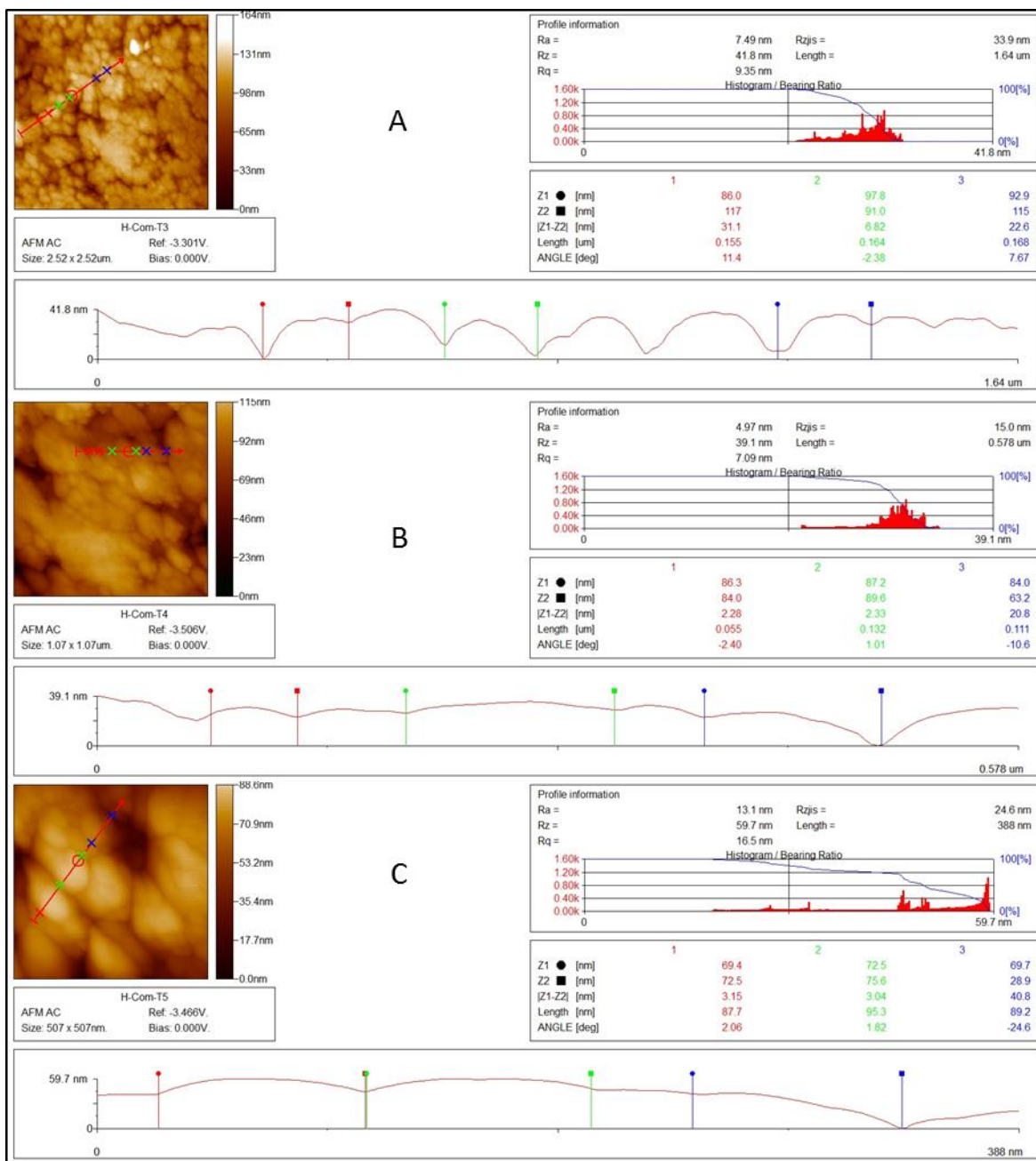


Figura 34. Análisis de tamaño de partícula mediante la técnica AFM para la muestra de hidroxiapatita a 600°C.

Para la muestra de hidroxiapatita dopada con flúor, se realizó un barrido en modo de contacto de 1 μm , donde se puede observar un material con formación granular, posteriormente se realizó un barrido de 500 nm donde se aprecian la formación de partículas esféricas de tamaño variable (figura 35). En la figura 36 se muestra el diagrama en donde se calcula el tamaño de partícula, con un acercamiento de 500 nm se observa que el tamaño oscila entre 11.6 y 14.5 nm.

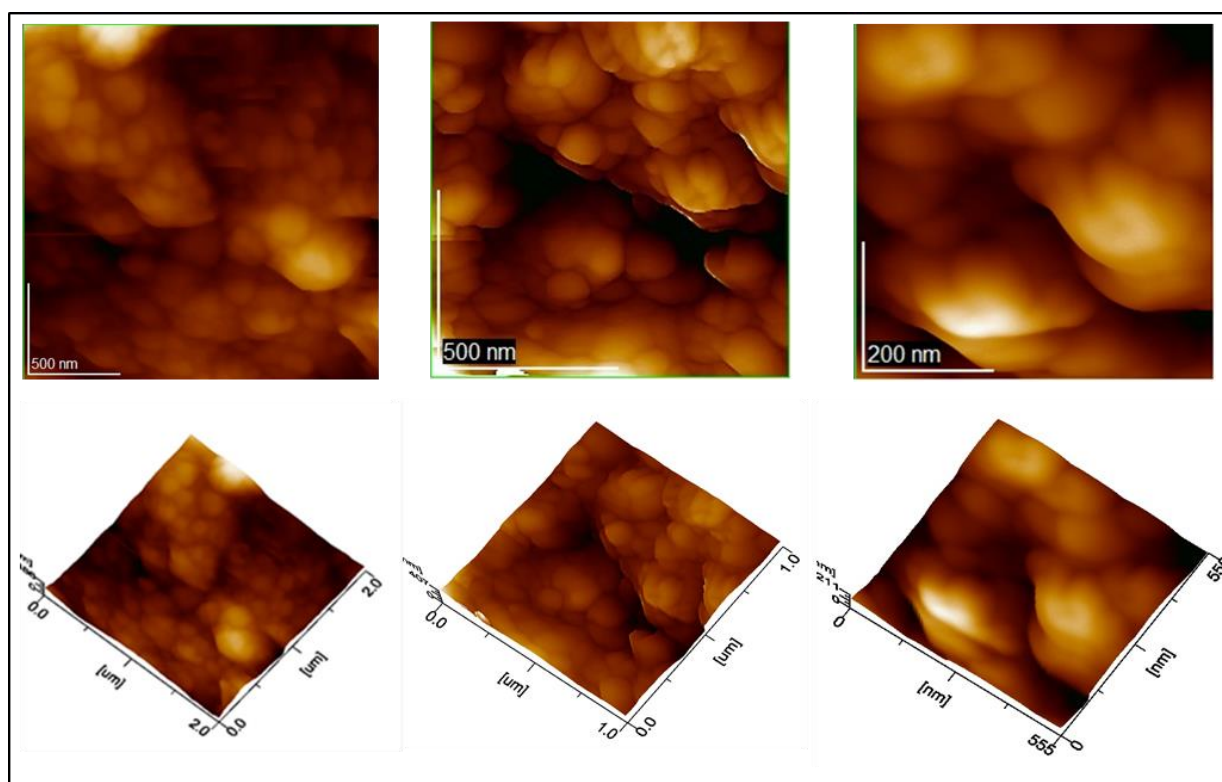


Figura 35. Micrografía por AFM para el material de hidroxiapatita con flúor a 600°C

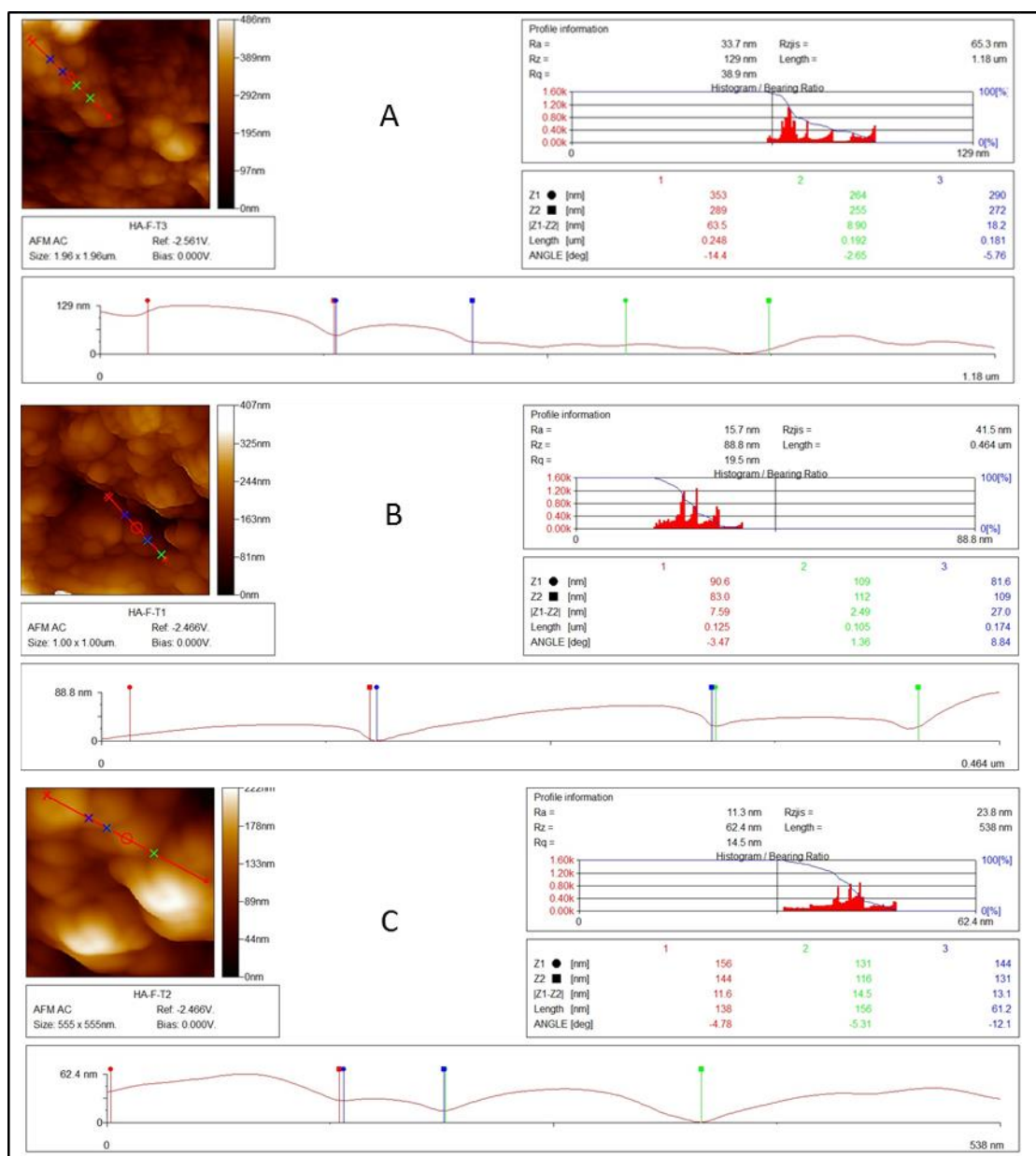


Figura 36. Análisis de tamaño de partícula mediante la técnica AFM para la muestra de hidroxiapatita dopada con flúor a 600°C.

Para la muestra de hidroxiapatita dopada con plata y flúor, primero se realizó un barrido en modo de contacto de 1.21 x 1.21 μm, donde se puede observar un material con formación granular, posteriormente se hizo un barrido de 544 x 544 nm en donde se aprecia la formación de una mezcla de partículas de tamaño irregular (figura 37) y la conformación de aglomerados

más compactos, lo cual es visible al observar mayor grado de cementación intragranular. En la figura 38 se muestra el diagrama en donde se calcula el tamaño de partícula que va en un intervalo de 1.34 a 46.8 nm cuando el acercamiento es de 500 nm. Aquí es apreciable partículas de mayor tamaño debido a la cementación intergranular de las nanopartículas.

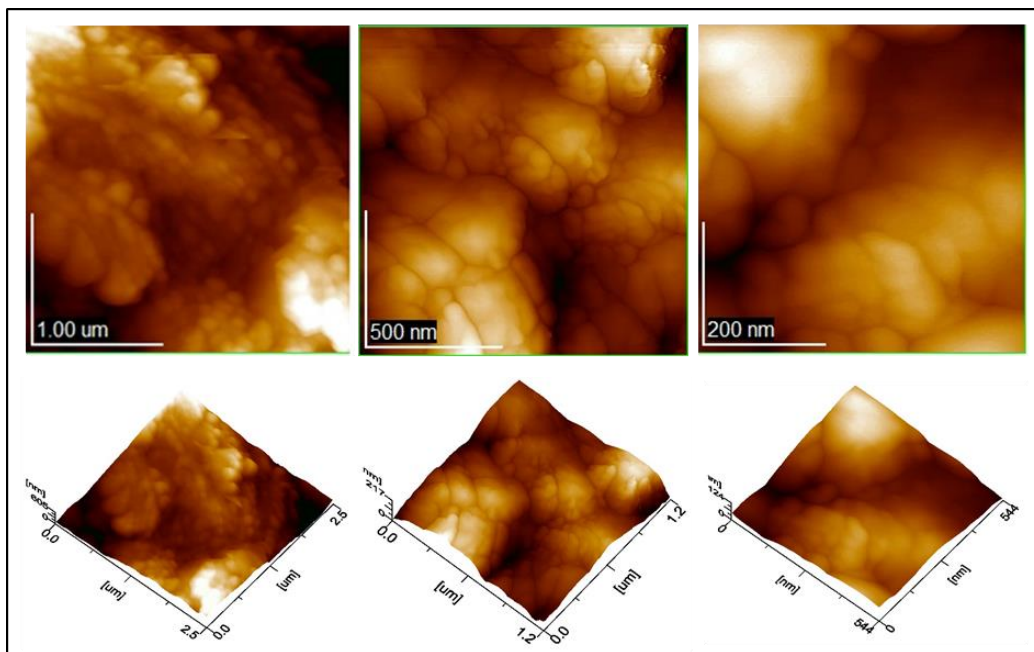


Figura 37. Microfotografía AFM del material de Hidroxiapatita dopada con plata y flúor a 600°C.

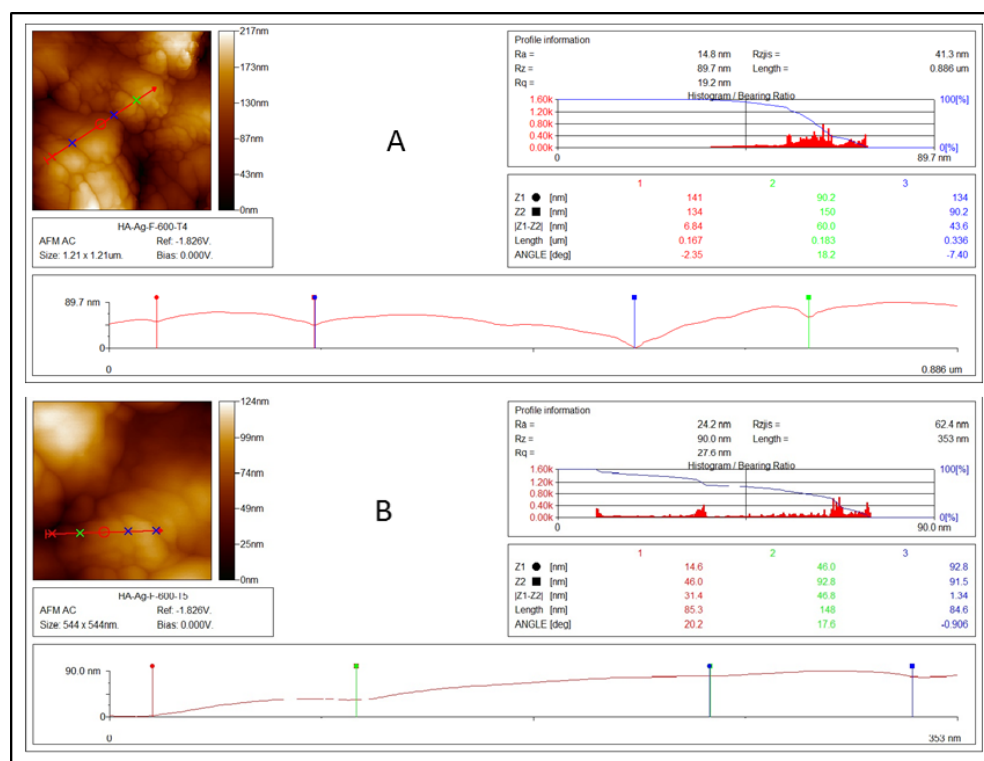


Figura 38. Análisis de tamaño de partícula mediante la técnica AFM para la muestra de hidroxiapatita dopada con plata y flúor a 600°C.

Se utilizó además la técnica de **microscopía electrónica de transmisión (MET)** en la que se puede identificar nuevamente el tamaño de partícula, y el patrón de difracción de electrones para cada una de las muestras preparadas. En la figura 39 se muestra un par de imágenes obtenidas del material de hidroxiapatita, una de ellas de campo oscuro en donde se observan aglomerados.

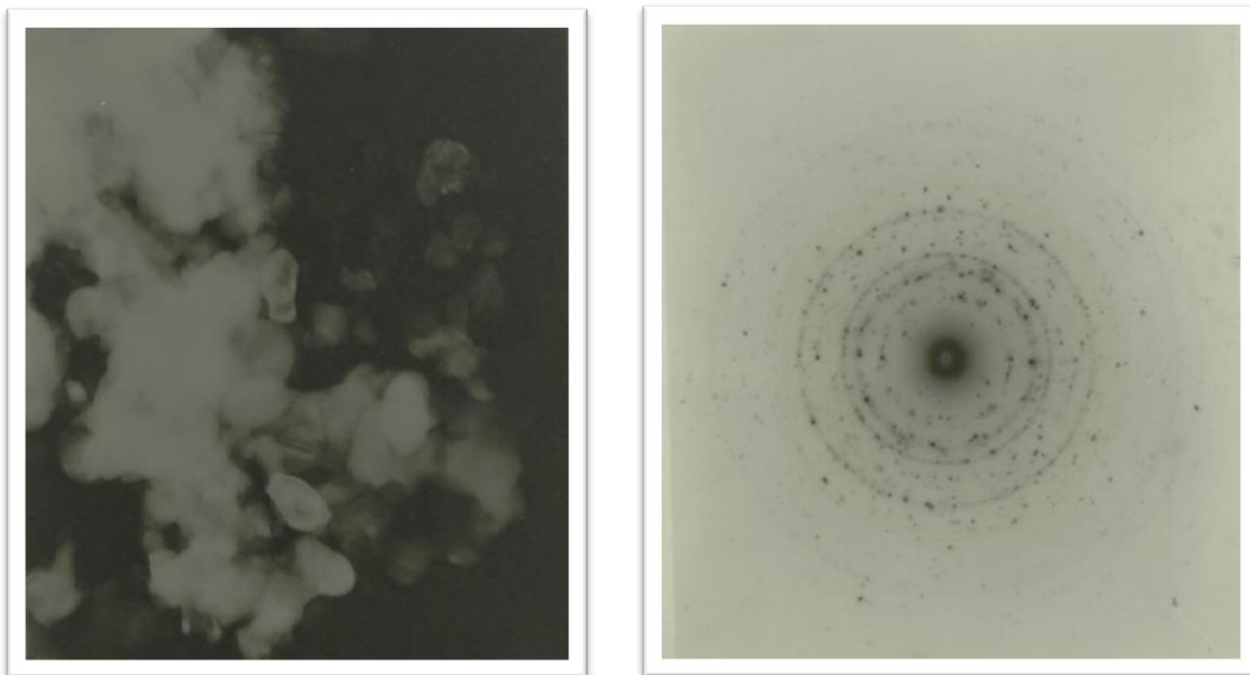


Figura 39. Imágenes MET del material de hidroxiapatita a 600°C, a la izquierda campo oscuro y a la derecha el patrón de difracción de anillos.

En la figura 40 se muestra un par de imágenes del material de hidroxiapatita con flúor con tratamiento térmico a 600°C, una de ellas (izquierda) de campo oscuro en donde se observan aglomerados y cristales con un tamaño de partícula de entre 50 y 100 nm; la otra es el patrón de difracción de anillos obtenido (derecha).

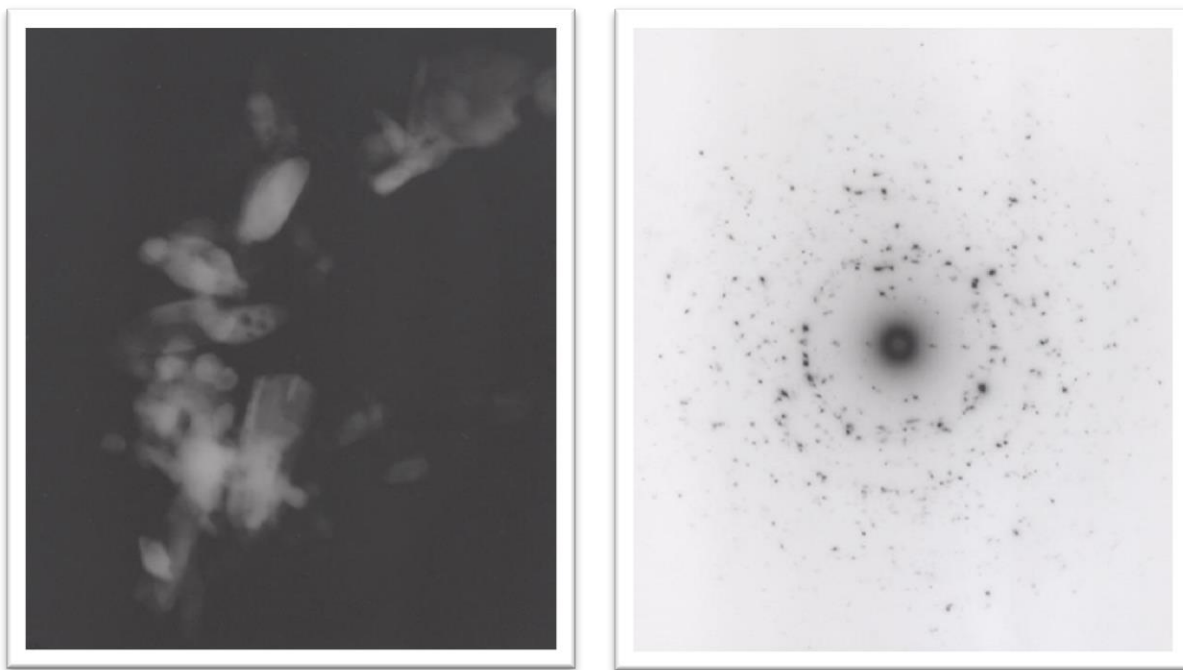


Figura 40. Imágenes MET del material de hidroxiapatita con flúor a 600°C, a la izquierda campo oscuro y a la derecha el patrón de difracción de anillos.

En la figura 41 se muestra un par de imágenes del material de hidroxiapatita dopada con plata y flúor con tratamiento térmico a 600°C, una de ellas (izquierda) de campo oscuro en donde se observan aglomerados y cristales con un tamaño de partícula de alrededor de los 100 nm; la otra (derecha) es el patrón de difracción de anillos obtenido.

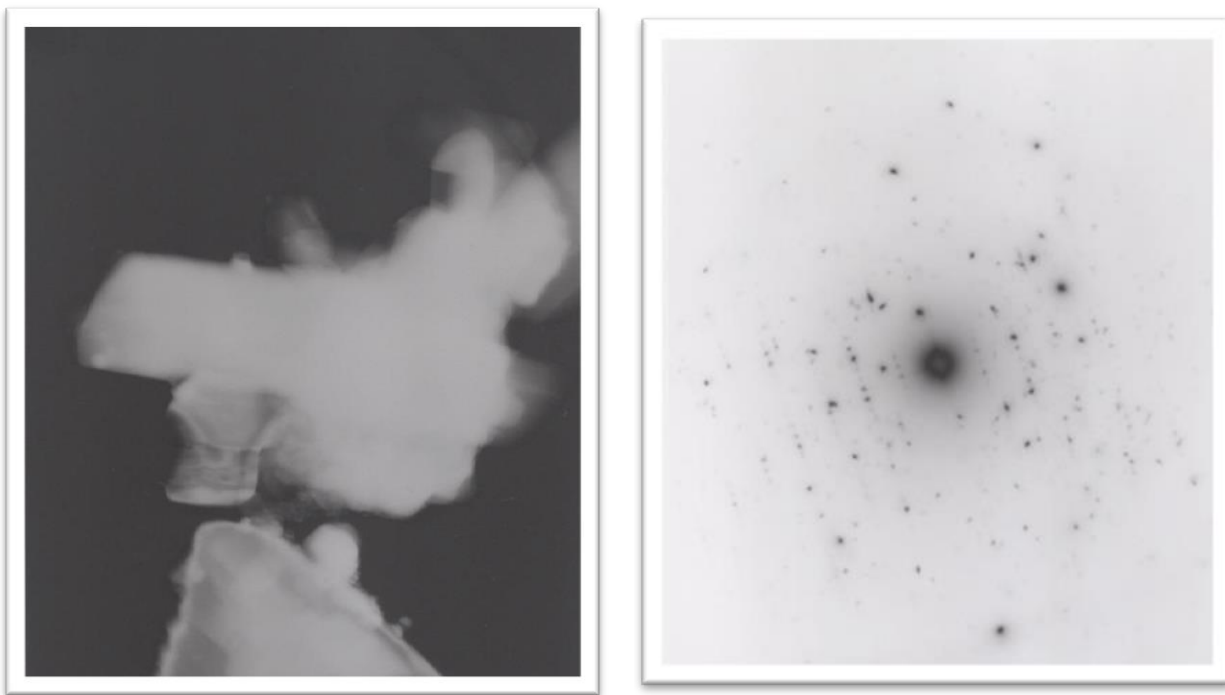


Figura 41. Imágenes MET del material de hidroxiapatita dopada con plata flúor a 600°C, a la izquierda campo oscuro y a la derecha el patrón de difracción de anillos.

Pruebas de biocompatibilidad

Después de transcurridos 7, 14, 30 y 90 días posteriores a la colocación de las diferentes formulaciones del biomaterial de hidroxiapatita con y sin agentes dopantes en forma de pastilla a nivel subdérmico e intramuscular, en ratas, se obtuvieron muestras de los tejidos circundantes de los ratones sacrificados. En la tabla 6 se muestran los resultados generales derivados del análisis histológico.

Tabla 6. Resultados generales del análisis histológico para evaluar la biocompatibilidad de los materiales formulados.

VPIN	BIOMATERIAL	LOCALIZACIÓN	PERIODO (días)	INFLAMACIÓN	TIPO	CGMN	MATERIAL
7	HA	SD	7	Sí	Severa Aguda	Ausente	Presente
9	HA	SD	7	No	Ausente	Ausente	Presente
11	HA	SD	7	No	Ausente	Ausente	Presente
8	HA	IM	7	Sí	Leve aguda	Ausente	Presente
10	HA	IM	7	No	Ausente	Ausente	Presente
12	HA	IM	7	Sí	Leve aguda	Escasa	Presente
45	HA	SD	14	No	Ausente	Ausente	Presente
50	HA	SD	14	No	Ausente	Escasa	Presente
48	HA	SD	14	Sí	Leve crónica	Abundante	Presente
46	HA	IM	14	Sí	Moderada crónica	Abundante	Presente
47	HA	IM	14	Sí	Leve crónica	Abundante	Presente
49	HA	IM	14	Sí	Leve crónica	Escasa	Presente
23	HA	SD	30	No	Ausente	Ausente	Ausente
25	HA	SD	30	No	Ausente	Ausente	Ausente
27	HA	SD	30	No	Ausente	Ausente	Ausente
24	HA	IM	30	No	Ausente	Escasa	Presente
26	HA	IM	30	No	Ausente	Ausente	Ausente
28	HA	IM	30	No	Ausente	Ausente	Ausente
73	HA	SD	90	Sí	Leve crónica	Escasa	Presente
75	HA	SD	90	No	Ausente	Ausente	Presente
77	HA	SD	90	No	Ausente	Ausente	Ausente
74	HA	IM	90	No	Ausente	Ausente	Presente
76	HA	IM	90	No	Ausente	Ausente	Ausente
78	HA	IM	90	No	Ausente	Ausente	Presente
13	HA-F	SD	7	No	Ausente	Ausente	Ausente
15	HA-F	SD	7	No	Ausente	Ausente	Presente
17	HA-F	SD	7	Sí	Moderada aguda	Ausente	Ausente
14	HA-F	IM	7	No	Ausente	Escasa	Presente
16	HA-F	IM	7	Sí	Leve aguda	Escasa	Presente
18	HA-F	IM	7	No	Ausente	Ausente	Ausente
52	HA-F	SD	14	No	Ausente	Ausente	Presente
54	HA-F	SD	14	No	Ausente	Ausente	Presente
55	HA-F	IM	14	No	Ausente	Abundante	Presente
51	HA-F	IM	14	Si	Leve crónica	Escasa	Presente

VPIN	BIOMATERIAL	LOCALIZACIÓN	PERIODO (días)	INFLAMACIÓN	TIPO	CGMN	MATERIAL
53	HA-F	IM	14	Sí	Escasa crónica	Ausente	Presente
29	HA-F	SD	30	No	Ausente	Ausente	Presente
31	HA-F	SD	30	Sí	Leve crónica	Ausente	Presente
33	HA-F	SD	30	No	Ausente	Ausente	Ausente
30	HA-F	IM	30	No	Ausente	Ausente	Ausente
32	HA-F	IM	30	No	Ausente	Ausente	Ausente
67	HA-F	SD	90	No	Ausente	Ausente	Presente
69	HA-F	SD	90	No	Ausente	Ausente	Ausente
71	HA-F	SD	90	No	Ausente	Ausente	Ausente
68	HA-F	IM	90	No	Ausente	Ausente	Presente
70	HA-F	IM	90	No	Ausente	Ausente	Presente
72	HA-F	IM	90	No	Ausente	Ausente	Presente
1	HA-Ag-F	SD	7	Sí	Moderada aguda	Ausente	Presente
3	HA-Ag-F	SD	7	Sí	Leve aguda	Ausente	Ausente
5	HA-Ag-F	SD	7	Sí	Severa Aguda	Ausente	Presente
2	HA-Ag-F	IM	7	Sí	Severa Aguda	Ausente	Ausente
4	HA-Ag-F	IM	7	Sí	Leve aguda	Ausente	Presente
6	HA-Ag-F	IM	7	Sí	Severa Aguda	Ausente	Presente
57	HA-Ag-F	SD	14	Sí	Severa crónica	Ausente	Presente
59	HA-Ag-F	SD	14	sí	Severa crónica	Ausente	Presente
58	HA-Ag-F	IM	14	Sí	Severa crónica	Escasa	Presente
60	HA-Ag-F	IM	14	Sí	Severa crónica	Escasa	Presente
35	HA-Ag-F	SD	30	Sí	Severa crónica	Abundante	Presente
37	HA-Ag-F	SD	30	Sí	Severa crónica	Abundante	Presente
36	HA-Ag-F	IM	30	Sí	Leve crónica	Ausente	Presente
38	HA-Ag-F	IM	30	Sí	Severa crónica	Abundante	Presente
40	HA-Ag-F	IM	30	Sí	Severa granulomatosa	Ausente	Presente
79	HA-Ag-F	SD	90	No	Ausente	Escasa	Presente
81	HA-Ag-F	SD	90	No	Ausente	Ausente	Ausente
83	HA-Ag-F	SD	90	No	Ausente	Ausente	Ausente
80	HA-Ag-F	IM	90	Sí	Moderada crónica	Abundante	Presente
82	HA-Ag-F	IM	90	No	Ausente	Escasa	Presente
84	HA-Ag-F	IM	90	No	Ausente	Ausente	Ausente
19	Gasa	SD	7	Sí	Severa Aguda	Escasa	Presente
21	Gasa	SD	7	Sí	Severa Aguda	Ausente	Presente

VPIN	BIOMATERIAL	LOCALIZACIÓN	PERIODO (días)	INFLAMACIÓN	TIPO	CGMN	MATERIAL
20	Gasa	IM	7	Sí	Severa Aguda	Ausente	Presente
21	Gasa	IM	7	Sí	Severa Aguda	Ausente	Presente
41	Gasa	SD	30	Sí	Severa crónica	Abundante	Presente
44	Gasa	IM	30	Sí	Severa crónica	Abundante	Presente
42	Gasa	IM	30	Sí	Severa granulomatosa	Abundante	Presente
85	Gasa	IM	30	Sí	Severa crónica	Abundante	Presente
86	Gasa	SD	90				
87	Gasa	SD	90	Sí	Severa crónica	Abundante	Presente
88	Gasa	IM	90	Sí	Severa crónica	Abundante	Presente

HA: hidroxiapatita; HA-F: hidroxiapatita con flúor; HA-Ag-F: hidroxiapatita dopada con plata y flúor; SD: subdérmica; IM: Intramuscular; CGMN: Células gigantes mononucleadas.

Análisis estadístico

Evaluación de la respuesta histológica del biomaterial de Hidroxiapatita (HA).

Después de 7 días de la colocación del biomaterial de hidroxiapatita a nivel subdérmico se observó que el 66.7% [2] de los casos no presentó inflamación y tampoco se observó la presencia de células gigantes multinucleadas (CGMN); a nivel intramuscular, para este mismo biomaterial, se observó que el 33.3% [1] de los casos no presentó inflamación, el 66.7 % [2] de los casos restantes presentó inflamación leve y de éstos el 55% (1 caso) presentó células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño (CGMN). En el 100% de los casos [6] se observó la presencia del biomaterial.

En la figura 42 se muestra un par de imágenes histológicas, después de 7 días, a nivel subdérmico VPIN9 (A) se observa tejido fibroadiposo marginal con septos vasculares y sin evidencia inflamación (HE-100X); y a nivel intramuscular VPIN8 (B) se observa reacción inflamatoria y pericapsular leve con desmoplasia marginal (HE-100X), se observa un espacio donde se ubicaba la pastilla.

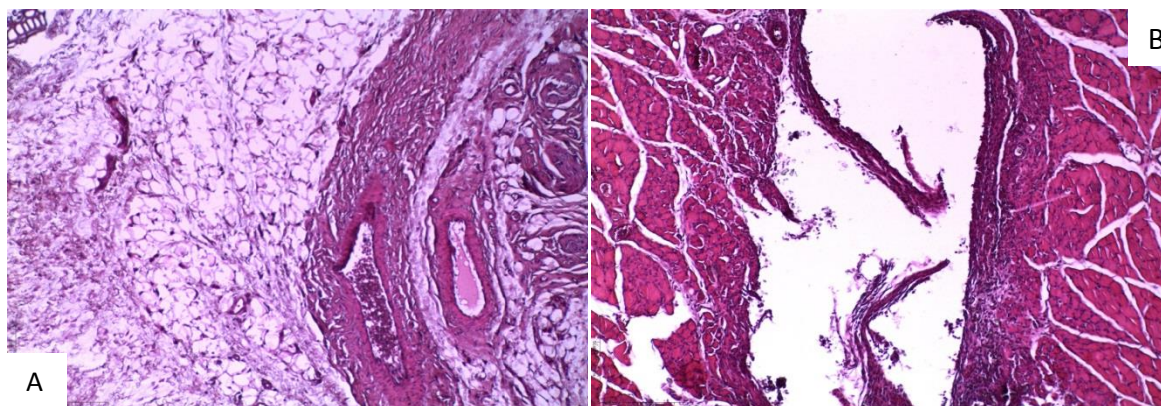


Figura 42. Imágenes de corte histológico del tejido que estuvo en contacto con el material de hidroxiapatita por 7 días.

A los 14 días se observó que a nivel subdérmico el 66.7% [2] de los casos no presentó inflamación y el 33% [1] presentó inflamación leve crónica con abundantes CGMN; a nivel intramuscular se observó inflamación en el 100 % [3] de los casos de los cuales en el 66.7 % [2] la respuesta inflamatoria fue leve y en el 33.3% [1] moderada. En el 100% [3] de los casos se observó la presencia de CGMN; para la respuesta inflamatoria leve, en el 50% [1] de los casos la presencia fue escasa y en el resto (1 caso) la presencia fue abundante; para la respuesta inflamatoria moderada la presencia de estas células fue abundante. En el 100% de los casos se observó la presencia del material.

En la figura 43 se muestra un par de imágenes histológicas, después de 14 días, a nivel subdérmico, se observa en VPIN45 (A) un límite más o menos preciso entre el proceso desmoplástico y el músculo estriado con prominencia de edema y disgregación de fibras musculares y congestión leve de vasos (HE-4X), no se observa presencia de inflamación; y a nivel intramuscular VPIN46 (B) se observan cambios degenerativos de las fibras musculares con edema intersticial (HE-10X) hay inflamación con presencia de CGMN.

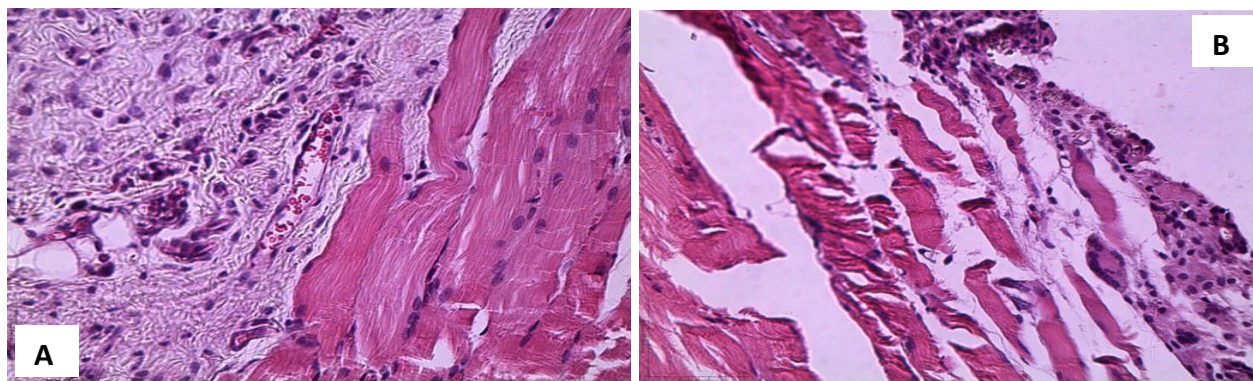


Figura 43. Imágenes de corte histológico del tejido que estuvo en contacto con el material de hidroxiapatita por 14 días.

A los 30 días se observó la ausencia de inflamación tanto para el nivel subdérmico como para el nivel intramuscular en el 100% [6] de los casos. Sólo se observó la presencia (escasa) de CGMN en el 33.3% [1] de los casos a nivel intramuscular. A nivel subdérmico en el 100% [3] de los casos el material se observó la ausencia del material; a nivel intramuscular se observó la presencia del material en el 33.3% [1] de los casos, en el resto no había.

En la figura 44 se muestra una imagen histológica a nivel subdérmico, después de 30 días, se observa en VPIN25 (A) material con marginación precisa por fascículo muscular, no se observa presencia de inflamación (HE-4X); y a nivel intramuscular VPIN26 (B) se observan fibras musculares estriadas adyacentes a fibras de colágena y fibroblastos hipertróficos en la zona de depósito del material con leve inflamación.

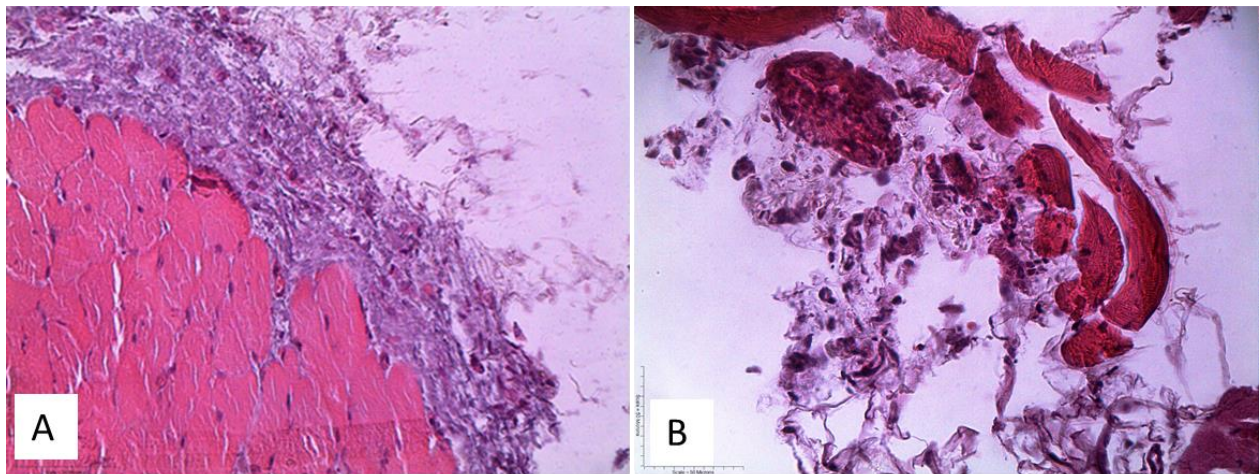


Figura 44. Imagen de corte histológico del tejido que estuvo en contacto con el material de hidroxiapatita por 30 días.

A los 90 días se observó a nivel subdérmico que el 66.7% [2] de los casos no presentó inflamación, y el 33.3% (1) de los casos presentó inflamación leve con escasa presencia de CGMN; a nivel intramuscular se observó ausencia de inflamación en el 100% de los casos, tampoco se observó presencia de CGMN. Con respecto al material se observó se encontraba ausente en el 33.3% de los casos tanto a nivel subdérmico como intramuscular.

En la figura 45 se muestra un par de imágenes histológicas, después de 90 días, a nivel subdérmico se observa en VPIN77 (A) el espacio que corresponde a la zona de inoculación de material experimental, además se observan, entremezcladas con el músculo estriado, fibras de colágena dispuestas irregularmente formando un estroma laxo de tejido conectivo; a nivel intramuscular VPIN78 (B) se observa la zona de implantación del material rodeada por segmentos de músculo estriado, en secciones longitudinales y transversales, sin alteraciones histológicas secundarias a la presencia del material. Limitando el remanente del material se observa una fina capa fibrosa; al interior se muestran zonas basófilas de aspecto granular.

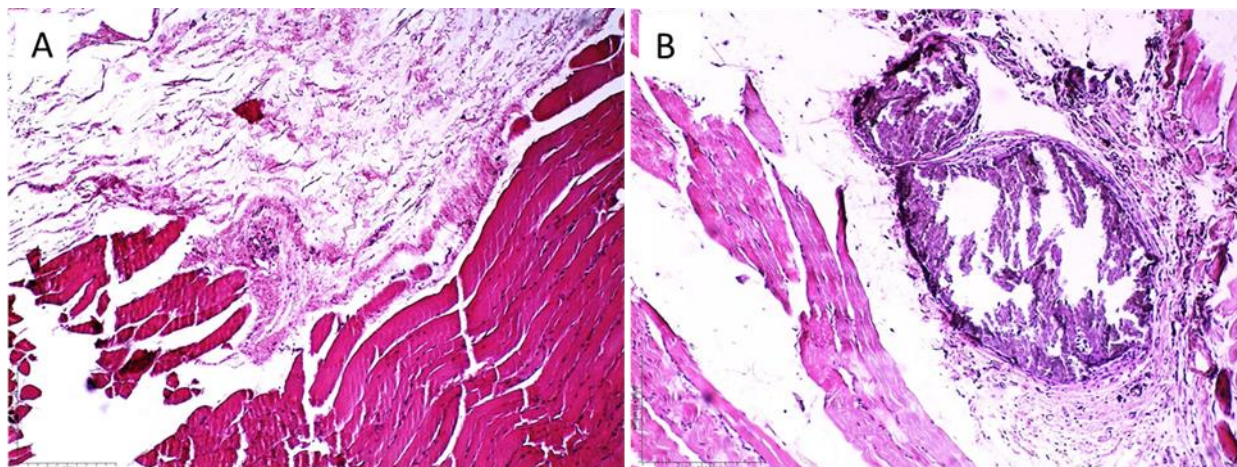


Figura 45. Imagen de corte histológico del tejido que estuvo en contacto con el material de hidroxiapatita por 90 días.

En la figura 46 se presenta un gráfico de la variación de la respuesta inflamatoria para el material de hidroxiapatita a los 7, 14, 30 y 90 días a nivel subdérmico e intramuscular.

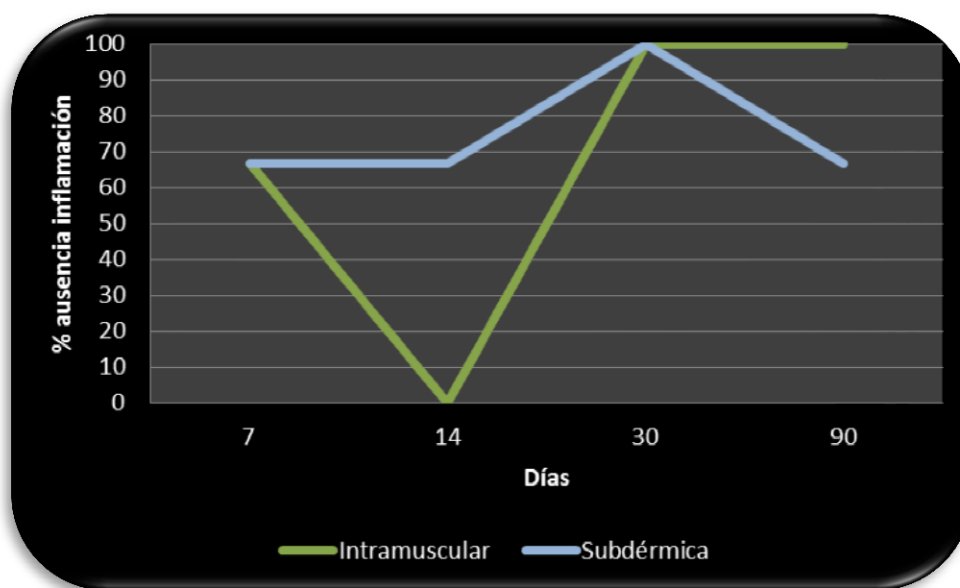


Figura 46. Ausencia de respuesta inflamatoria al biomaterial de hidroxiapatita.

Evaluación de la respuesta histológica del biomaterial de **Hidroxiapatita con flúor (HA-F)**.

Después de 7 días de colocación del biomaterial de hidroxiapatita-flúor a nivel subdérmico se observó que el 66.7% [2] de los casos no presentó inflamación y el 33.3% [1] de los casos presentó inflamación moderada aguda sin la presencia de CGMN; a nivel intramuscular, para este mismo biomaterial, se observó que el 66.7% [2] de los casos no presentó inflamación, sin embargo se observó la presencia escasa y abundante de CGMN para cada uno de los casos respectivamente; y el 33.3 % [1] de los casos restantes presentó respuesta inflamatoria leve aguda con presencia escasa de CGMN. En el 33.3% (1) de los casos se observó la ausencia de material y en el 66.7% [2] restante se observó la presencia del biomaterial.

En la figura 47 se muestra un par de imágenes histológicas, después de 7 días, a nivel subdérmico VPIN15 (A) en donde se observa material subdérmico con marginación muscular estriada del lecho sección longitudinal (HE-4X), sin evidencia inflamación; y a nivel intramuscular VPIN16 (B) en donde se observa material con marginación muscular estriada del lecho sección transversal, con inflamación leve (HE-4X).

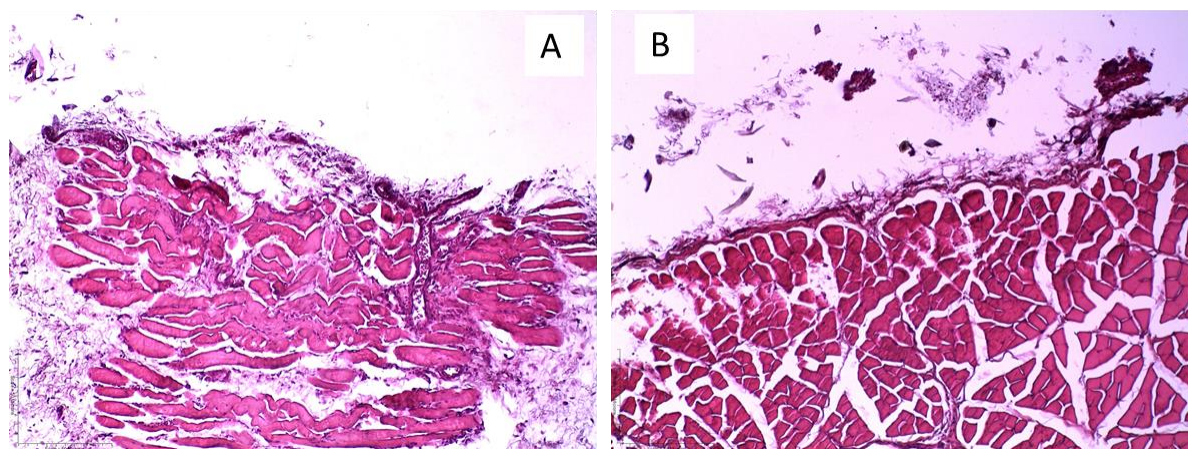


Figura 47. Imágenes de corte histológico del tejido que estuvo en contacto con el material de hidroxiapatita-flúor por 7 días.

A los 14 días, a nivel subdérmico, se observó la ausencia de inflamación en el 100% [2] de los casos, tampoco se observaron CGMN. A nivel intramuscular se observó la ausencia de inflamación en el 33.3% [1] de los casos y en el 66.7% [2] de los casos restantes se observó respuesta inflamatoria escasa y leve (crónicas) respectivamente. Con respecto a la presencia de CGMN se observó presencia escasa en uno de los casos de repuesta inflamatoria leve. En el 100% [6] de los casos se observó la presencia del biomaterial.

En la figura 48 se muestra un par de imágenes histológicas, después de 14 días, a nivel subdérmico VPIN54 (A) en donde se observa material mal preservado y marginado por una banda de fibrosis adyacente al tejido fibroadiposo (HE-4X), sin evidencia inflamación; y a nivel intramuscular VPIN55 (B) en donde se observa material de estudio en la parte superficial de la imagen marginado por fibrosis, se observa la presencia de células gigantes tipo cuerpo extraño. Note el material fácilmente visible en las células del lado derecho de la imagen (rojo).

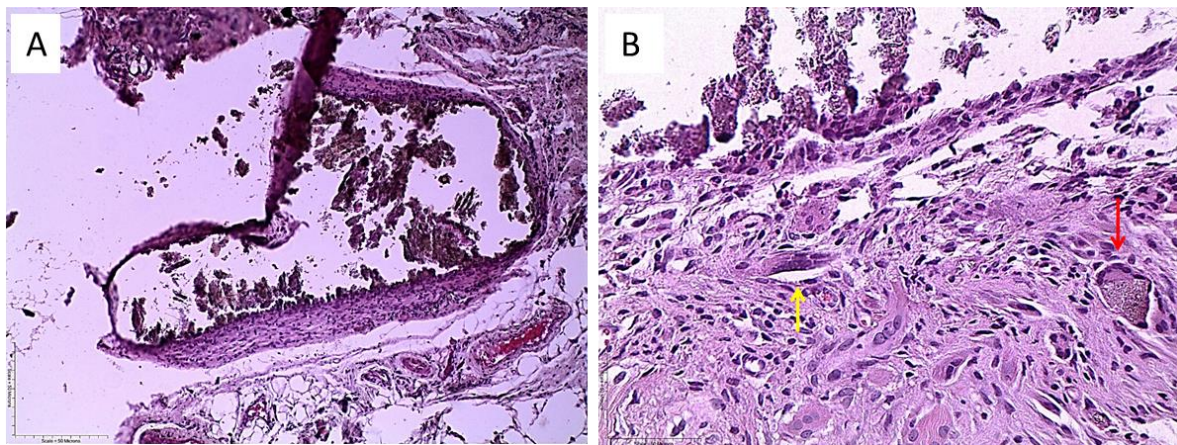


Figura 48. Imágenes de corte histológico del tejido que estuvo en contacto con el material de hidroxiapatita-flúor por 14 días.

A los 30 días, a nivel subdérmico, se observó la ausencia de inflamación en el 33.3% [1] de los casos y en el 66.7% [2] restante se observó respuesta inflamatoria leve crónica, en ningún caso se observó la presencia de CGMN. En el 33.3% (1) de los casos se observó la presencia del material y en el 66.7% [2] el material se encontraba ausente. A nivel intramuscular, se observó la ausencia de respuesta inflamatoria en el 100% [2] de los casos, tampoco se observó la presencia de CGMN, así mismo se observó la ausencia material en todos los casos.

En la figura 49 se muestra un par de imágenes histológicas, después de 30 días, a nivel subdérmico VPIN31 (A) en donde se observa material central marginado y entre fibras musculares, con presencia de inflamación leve (HE-4X); y a nivel intramuscular VPIN30 (B) en donde se observa material intersticial con degeneración hialina de fibras musculares y con ausencia de inflamación (HE-4X).

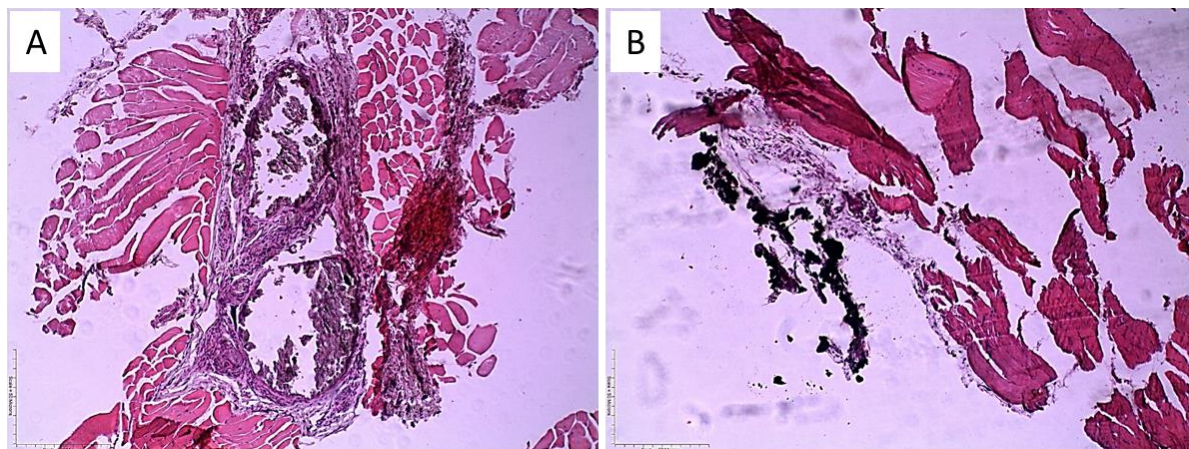


Figura 49. Imágenes de corte histológico del tejido que estuvo en contacto con el material de hidroxiapatita-flúor por 30 días.

A los 90 días se observó que tanto a nivel subdérmico como a nivel intramuscular el 100% [3] de los casos (por área) no presentó inflamación, tampoco se observó la presencia de CGMN en

ningún caso y se observó ausencia del biomaterial en el 66.7% (2) de los acasos a nivel subdérmico, y se encontró presente en el 100% [3] de los casos a nivel intramuscular.

En la figura 50 se muestra un par de imágenes histológicas, después de 90 días, a nivel subdérmico VPIN67 (A) en donde se observa un estroma de tejido conjuntivo fibroso, mayormente laxo en cuyo centro se identifica material inerte limitado por un delgada capa de tejido fibroso, remanente del tejido de granulación formado con antelación; este se encuentra caracterizado por algunos macrófagos, fibroblastos y colágena, más densa a la del estroma. El interior de esta zona, delimitada, se muestra un área de aspecto granular, basófila y con presencia irregular de partículas birrefringentes (HE-100X); y a nivel intramuscular VPIN68 (B) en donde se observa un área central basófila que corresponde a zona de implantación de material con una fina capa fibrosa que rodea el resto del material inoculado, rodeando lo descrito se observan secciones longitudinales de músculo esquelético sin alteración (HE-100X).

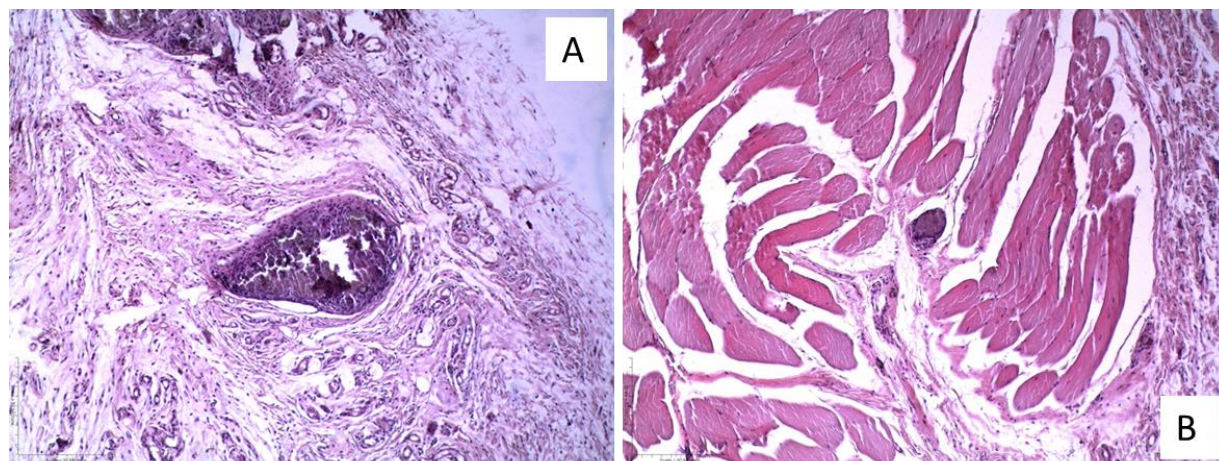


Figura 50. Imágenes de corte histológico del tejido que estuvo en contacto con el material de hidroxiapatita-flúor por 90 días.

En la figura 51 se presenta un gráfico de la variación de la respuesta inflamatoria para el material de hidroxiapatita-flúor a los 7, 14, 30 y 90 días a nivel subdérmico e intramuscular.

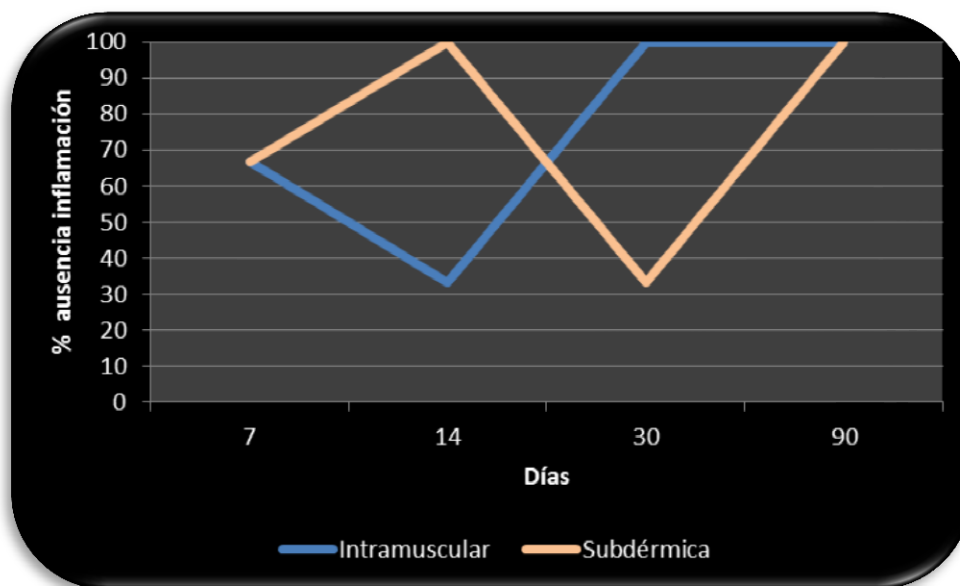


Figura 51. Ausencia de respuesta inflamatoria al biomaterial de hidroxiapatita-flúor

Evaluación de la respuesta histológica del biomaterial de **Hidroxiapatita con plata y flúor (HA-Ag-F)**.

Después de 7 días de la colocación del biomaterial de hidroxiapatita con plata y flúor a nivel subdérmico se observó respuesta inflamatoria aguda en el 100% [3] de los casos, de los cuales el 33.3% [1] fue respuesta inflamatoria leve, 33.3% [1] fue respuesta inflamatoria moderada y el 33.3% [1] restante fue respuesta inflamatoria severa. En ningún caso se observó la presencia de CGMN; con respecto al material, se observó su ausencia en el 33.3% [1] de los casos. A nivel intramuscular, para este mismo biomaterial, se observó que en el 100% de los casos se presentó respuesta inflamatoria aguda, de los cuales en el 33.3% [1] la respuesta inflamatoria fue leve y en el 66.7% [2] fue severa. En ningún caso se observó la presencia de CGMN; con respecto al material se observó la ausencia en un 33.3% [1] de los casos.

En la figura 52 se muestra un par de imágenes histológicas, después de 7 días, a nivel subdérmico VPIN5 (A) en donde se observa necrosis central del proceso inflamatorio y desmoplásico con tejido adiposo marginal (HE-4X); y a nivel intramuscular VPIN4 (B) en donde se observa una reacción inflamatoria intersticial con material HA-Ag-F disgregando fibras musculares estriadas (HE-10X).

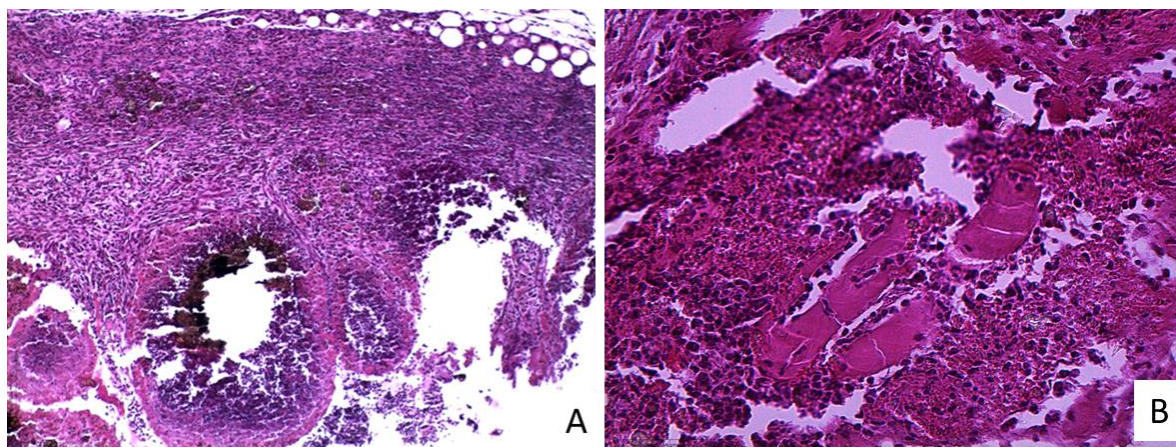


Figura 52. Imágenes de corte histológico del tejido que estuvo en contacto con el material de hidroxiapatita-plata- flúor por 7 días.

A los 14 días, a nivel subdérmico, se observó respuesta inflamatoria severa crónica en el 100% [2] de los casos, sin embargo no se observó la presencia de CGMN. En el 100% [2] de los casos se observó la presencia del material. A nivel intramuscular, se observó la presencia de inflamación severa crónica en el 100% [2] de los casos, en los que también se observó la presencia escasa de CGMN; se observó la presencia de material en el 100% [2] de los casos.

En la figura 53 se muestra un par de imágenes histológicas, después de 14 días, a nivel subdérmico VPIN57 (A) en donde se observa una panorámica de un fondo de fibrosis con inflamación crónica y depósitos del material en el lado derecho de la imagen (HE-4X); y a nivel intramuscular VPI60 (B) se observa edema en la conjunción de las fibras musculares estriadas y banda desmoplásica con depósitos intersticiales e intracelulares de material (HE-10X).

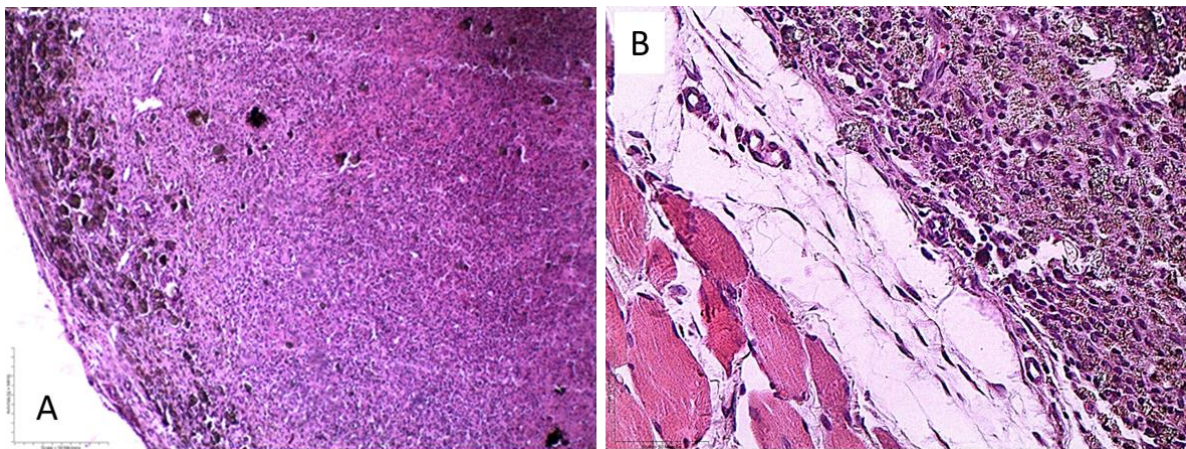


Figura 53. Imágenes de corte histológico del tejido que estuvo en contacto con el material de hidroxiapatita-plata- flúor por 14 días.

Transcurridos 30 días, a nivel subdérmico, se observó la presencia de respuesta inflamatoria severa crónica en el 100% [2] de los casos, en los que también se observó la presencia abundante de CGMN; se observó la presencia del material en el 100% [2] de los casos. A nivel intramuscular, se observó la presencia de respuesta inflamatoria en el 100% [3] de los casos, de los cuales el 33.3% [1] fue leve crónica, y el 66.7% [2] fue severa crónica y granulomatosa respectivamente. Solo en el caso de respuesta inflamatoria severa crónica se observó la presencia abundante de CGMN. En el 100% [3] de los casos se observó la presencia del material.

En la figura 54 se muestra un par de imágenes histológicas, después de 30 días, a nivel subdérmico VPIN37 (A) en donde se observa materia intersticial en un fondo desmoplásico e inflamatorio crónico con células gigantes multinucleadas tipo cuerpo extraño (HE-40X); y a nivel intramuscular VPIN40 (B) se observa material con grados variables de preservación, inflamación y prominencia de estructuras vasculares (HE-4X).

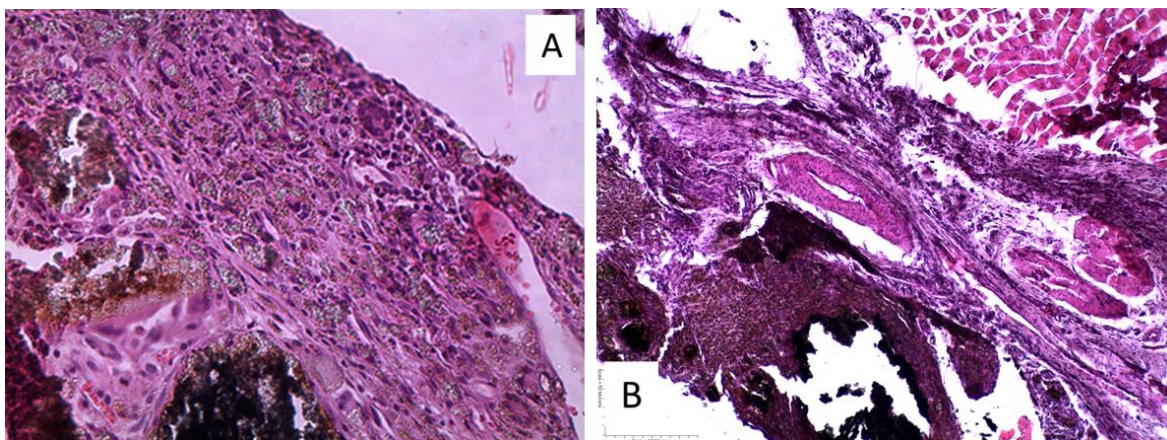


Figura 54. Imágenes de corte histológico del tejido que estuvo en contacto con el material de hidroxiapatita-plata- flúor por 30 días.

A los 90 días se observó que a nivel subdérmico el 100% [3] de los casos no presentó inflamación, sin embargo en el 33.3% [1] de los casos se observó la presencia de CGMN; a nivel intramuscular se observó ausencia de inflamación en el 66.7% [2] de los casos, uno de estos casos presentó escasa presencia de CGMN, la respuesta inflamatoria crónica fue moderada con abundante presencia de CGMN en el único caso en la que se presentó. Con respecto a la presencia de material, se observó que a nivel subdérmico, en el 66.7% [2] de los casos estaba ausente, a nivel intramuscular se observó ausente en el 33.3 % [1] de los casos.

En la figura 55 se muestra un par de imágenes histológicas, después de 90 días, a nivel subdérmico VPIN83 (A) en donde se observa la zona donde se encontraba el material, misma que se encuentra rodeada por un estroma fibroadiposo, con fibras colágenas laxas. Cerca del área de mayor permanencia del material se observa área hialinizada cerca de un artefacto por pinzado (HE-40X); y a nivel intramuscular VPIN84 (B) se observa detalle del área con pérdida de la arquitectura muscular, con restos de hemosiderina (evidencia de hemorragia antigua), también es posible identificar células musculares hipertróficas, posiblemente en un intento de regeneración (HE-40X).

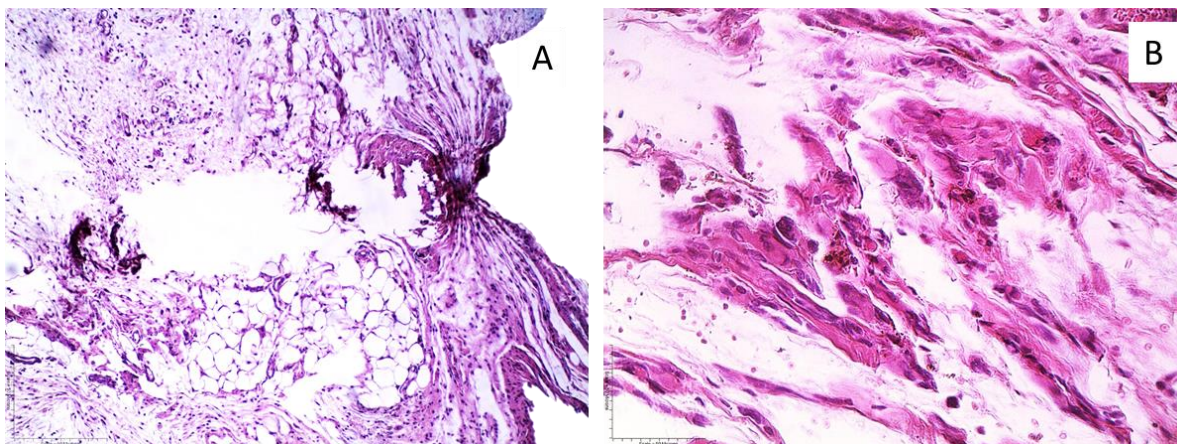


Figura 55. Imágenes de corte histológico del tejido que estuvo en contacto con el material de hidroxiapatita-plata- flúor por 90 días.

En la figura 56 se presenta un gráfico de la variación de la respuesta inflamatoria para el material de hidroxiapatita-plata-flúor (HA-Ag-F) a los 7, 14, 30 y 90 días a nivel subdérmico e intramuscular.

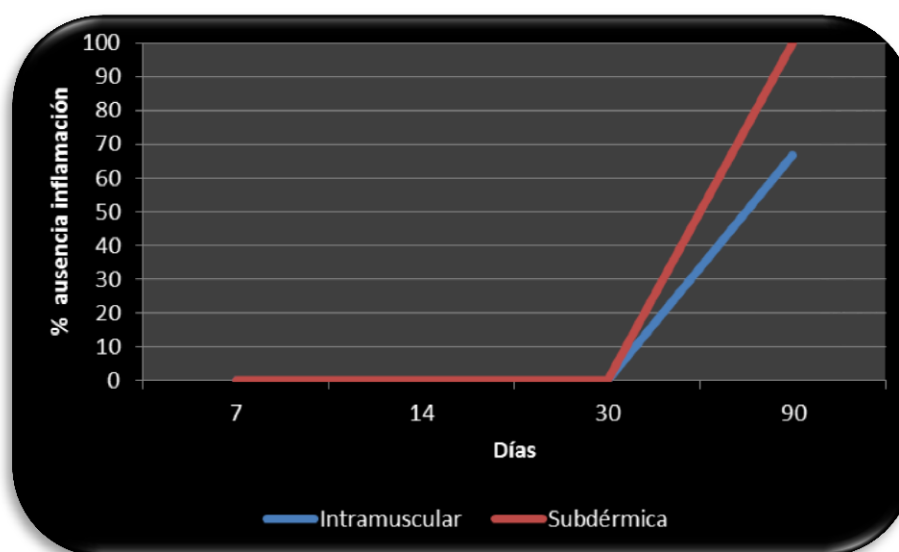


Figura 56. Respuesta inflamatoria al biomaterial de hidroxiapatita-plata-flúor.

En cuanto al control, se utilizó gasa, pues de antemano se sabe que es incompatible con los tejidos, en todos los casos (7, 14, 30 y 90 días) se observó la presencia de inflamación junto con la presencia de CGMN.

6.1 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la síntesis de hidroxiapatita se obtuvo un polvo blanco (fino) que es característico de la hidroxiapatita y coincide con lo que Rivero R y *col* en 2007 (12) reportaron como resultado al obtener hidroxiapatita por el método de combustión, lo mismo ocurrió con el producto obtenido del material de hidroxiapatita con flúor, que fue un polvo más fino que el de HA, sin embargo el material de hidroxiapatita con plata y flúor generó un polvo amarillento un poco más grueso y menos fino que los dos primeros.

Durante la sinterización de los tres sistemas (proceso de combustión) no se tuvo un control de la temperatura, sin embargo posterior a la obtención del polvo se dio un tratamiento térmico a 600°C y 900°C para asegurar la formación de un material cristalino.

Para la muestra de hidroxiapatita, en los análisis por IR se observan bandas correspondientes a las vibraciones de OH^- , PO_4^{3-} en posiciones similares a las reportadas por otros autores para la HA (12); además se confirma su presencia con los análisis por difracción de rayos X en donde se identifican fases cristalinas con la presencia de hidroxiapatita y fosfato de calcio. El difractograma obtenido para la muestra de hidroxiapatita muestra picos para la identificación de HA en la región de 30 a 35 que es lo característico para este mineral. De acuerdo con Samir K Ghosh, y *col* (31) la presencia de fosfatos de calcio adicionales a la hidroxiapatita pueden deberse a un tiempo de reacción prolongado, para el caso de las muestras sinterizadas en este proyecto, la duración del proceso de combustión, desde el inicio de la aparición de vapores hasta el cese completo de estos, fue aproximadamente de 40 minutos, posteriormente se dio un tratamiento térmico a 600°C con una rampa de calentamiento de 5°C por minuto durante 4 horas. Este tiempo de calentamiento pudo haber ocasionado la formación de los otros compuestos de fosfato. La reacción de combustión generó grandes cantidades de calor a partir de la reacción exotérmica de nitratos y urea generando la fase cristalina de HA. Una vez

obtenido el patrón de difracción de la HA a 600°C y haber constatado la presencia del mineral pero en poca cantidad, se sometió la muestra (al igual que las otras) a un tratamiento térmico a 900°C, para tratar de observar un cambio en la cristalización del compuesto, sin embargo los resultados muestran la ausencia de HA al incrementar la temperatura del tratamiento térmico. Observando en patrón de difracción obtenido por MET, se observa una fase cristalina por los dos anillos concéntricos alrededor del punto central, sin embargo, esta fase cristalina no es única ya que también se observa la presencia de puntos dispersos que pueden atribuirse a fases amorfas, razón por la cual en el difractograma de rayos X se observan picos definidos (en la parte central) mezclados con picos poco definidos y anchos (en los extremos) que pueden atribuirse a material amorfo que no alcanzó a cristalizar. El tamaño de grano cristalino se determinó a través de la técnica de MFA, en donde se observaron granos de un tamaño variable entre 3.04 y 40.8 nm a un acercamiento de 500 nm. Las imágenes por MEB muestran la obtención de un material con una morfología de partículas aglomeradas con tamaños variables, misma que se observa también en las imágenes obtenidas a través de la técnica MFA. Tiene el aspecto de un material poroso tipo espuma debido a la propia naturaleza de reacción en la que se observó una gran generación de gases. A pesar de que en las microfotografías se observan aglomerados particulares, se pueden distinguir algunas formas esféricas de las partículas. Esta forma esférica se confirma con las imágenes obtenidas a través de MFA en donde se aprecia la formación del grano de la partícula. Las imágenes en tres dimensiones muestran los diferentes tamaños de partícula obtenidos.

Con respecto al material de hidroxiapatita dopado con flúor, se obtuvo, como se mencionó anteriormente, un polvo fino de color blanco. Los análisis por la técnica IR muestran un espectro similar al de la hidroxiapatita, sin embargo se identifican señales débiles en la región cercana a los 3300 cm^{-1} según como lo menciona Tanaka y col (73) y en la región cercana a 600 cm^{-1} se observa una señal que puede asociarse a la presencia de $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ de acuerdo a

como lo indica W.E. Klee, *y col* (72). Por la composición de esta formulación, se esperaba obtener fluoroapatita a través de la sinterización, presencia que se comprueba de mejor manera a través de la técnica de difracción de rayos X ya que en el difractograma se observan picos correspondientes con este mineral, además se observó también la presencia de fluorita y de fosfato de calcio, probablemente faltó mayor temperatura al momento de la combustión. Razón por la que se sometió la muestra a un tratamiento térmico a 900°C por 8 horas, y se muestra la desaparición del fosfato de calcio y aumenta la presencia de fluoroapatita. A través del estudio de XPS se encontró que el átomo de flúor presente en la muestra tiene una configuración 1s que es compatible con el estado de oxidación del flúor (-1) presente tanto en la fluoroapatita como en la fluorita. El tamaño de grano cristalino se determinó a través de la técnica de MFA, en donde se observaron granos de un tamaño variable entre 11.6 y 14.5 nm a un acercamiento de 500 nm. Las micrográficas obtenidas por MEB con aumentos de 5,000X y 10,000X presentan un material sólido en donde se observan unas partes un poco más claras y otras más oscuras, esto puede deberse en parte a los planos de profundidad a los que se captura la imagen. Las partes más claras pueden ser en donde está la presencia del flúor. A mayores aumentos se alcanza a apreciar la formación de cristales sin embargo no se alcanza a apreciar su forma para constatar que sean de configuración hexagonal como lo indica la literatura (77). En las imágenes de campo oscuro obtenidas a través de la técnica de MET se observan partículas redondas mezcladas con partículas de forma alargada, sin embargo no hay una definición clara, lo que se constata con el patrón de difracción obtenido que muestra una gran cantidad de material amorfo ya que no se distinguen muy bien los anillos del patrón de cristalización.

Con respecto al material de hidroxiapatita dopado con plata y flúor, se obtuvo un material en forma de polvo grueso color amarillo oscuro, esto se atribuye a la presencia de la plata en su composición que en presencia de luz puede modificar su estado de oxidación. No se encontró

referencia bibliográfica para comparar las propiedades de este material, sin embargo de manera general se logró identificar la presencia de la plata, flúor e hidroxiapatita por medio de las diferentes técnicas de caracterización utilizadas. A través de la espectroscopía infrarroja se logró identificar la presencia de enlaces OH-F en la región de 722 cm^{-1} , se identificaron señales correspondientes con la presencia de enlaces tipo PO_4^{3-} asociados a la hidroxiapatita, y de AgNO_3 , esto puede asociarse con la presencia del elemento nitrógeno en la formulación de los precursores utilizados, sin embargo a través de la técnica de difracción de rayos X se identificó la presencia de Ag_3PO_4 . En este compuesto la plata se encuentra en estado iónico mismo que se pudo constatar a través de la técnica de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X. A través de la técnica de MEB se observó que la estructura del material ya no es esférica como en el caso de los materiales HA y HA-F, en su lugar se alcanzan a apreciar estructuras con forma geométrica definida tipo rectangular, entre otras formaciones sin definición, también se observan agregados más blancos que corresponden a la presencia de la plata (elemento con mayor número atómico). A través de la técnica de AFM se puede observar que las partículas de con forma geométrica definida en donde solo se observa un plano de su estructura están mezcladas con formas sin definición, el tamaño de partícula varía entre 1.34 y 46.8 nm a un acercamiento de 500 nm, sin embargo a través de la técnica de MET el patrón de difracción no es muy claro ya que no se alcanzan a ver muy definidos los anillos.

Con respecto a las pruebas de biocompatibilidad del material de hidroxiapatita se observó que más del 60% de los casos en cada uno de los diferentes tiempos de evaluación no presentó respuesta inflamatoria más allá de los límites considerados normales para la respuesta fisiológica de la reparación del tejido del sitio en donde se colocó la pastilla, lo que puede asociarse a una buena tolerancia al material por parte de la rata. Esto es congruente con lo reportado en la bibliografía ya que la hidroxiapatita se utiliza como biomaterial para aplicaciones biomédicas (30, 78), tal vez la razón por la cual se presentó una respuesta

inflamatoria mayor, fue que el material no fue esterilizado, por lo que pudo haber contenido algún contaminante que ocasionó esta respuesta inflamatoria, y también por la respuesta natural de los tejidos a las lesiones. Aunque a los 7 días era de esperarse la presencia de tal respuesta por el propio procedimiento realizado para la colocación de la pastilla, ya que a nivel subdérmico se originó una herida y se separó la piel del músculo, esto genera una respuesta propia de inflamación, que fue observada en el 33.1% de los casos, sin embargo a nivel intramuscular la ausencia de respuesta inflamatoria fue menor ya que solo el 33.3% de los casos no la presentó. La manipulación para la colocación del material en forma intramuscular fue más traumática, ya que se tuvo que separar la fibra muscular con una pinza de disección, originando una lesión aún mayor que a nivel subdérmico, a esta razón se puede asociar la observación a nivel intramuscular de mayor presencia de inflamación, además también se detectó la presencia de células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño que es una reacción de fagocitosis típica cuando los macrófagos son superados en cantidad o tamaño de las partículas a fagocitar. Estas respuestas inflamatorias se clasificaron como agudas. A los 14 días, a nivel subdérmico, no se presentaron cambios en cuanto a la respuesta inflamatoria, sin embargo a nivel intramuscular se observó que la ausencia de inflamación no existía como tal; a partir de este momento a los 30 y 90 días la respuesta mejoró sustancialmente ya que se observó la ausencia de inflamación en el 100% de los casos; pero no se mantuvo a nivel subdérmico ya que a los 90 días de evaluación solo el 66.6% de los casos no presentaron respuesta inflamatoria. Con respecto a la presencia o ausencia del material en los análisis histológicos, se detectó que este comenzó a desaparecer a partir de los 30 días, por ejemplo a los 90 días, a nivel subdérmico, no había ya material presente lo que puede asociarse o a una eliminación total a través de macrófagos. A nivel intramuscular se observó la ausencia del material en el 66.6% de los casos.

Con respecto al material de hidroxiapatita dopado con flúor, en el que se identificó la presencia de fluoroapatita y fluorita, se observó que, tanto a nivel subdérmico como intramuscular, se comenzó la evaluación con la misma respuesta inflamatoria, ya que el 66.7% de los casos no presentó inflamación más allá de los parámetros fisiológicos esperados. Al igual que en el caso del material de hidroxiapatita, este material no fue esterilizado y el procedimiento de colocación de la pastilla en ambos sitios causó lesión en el tejido. La dinámica de este proceso fue totalmente diferente al primero, ya que el gráfico de evolución muestra un patrón inverso. A los 14 días de evaluación, a nivel subdérmico la respuesta inflamatoria estaba ausente en el 100% de los casos lo que se puede asociar a una rápida recuperación de las lesiones causadas por la colocación del material y a que éste material fue mejor tolerado que la HA en las mismas condiciones; a nivel subdérmico la ausencia de respuesta inflamatoria fue solo en el 33.3% de los casos, sin embargo la respuesta inflamatoria observada fue escasa y leve y solo en esta última se observó la presencia escasa de CGMN. A los 30 días el comportamiento cambió ya que se observó una disminución de ausencia de respuesta inflamatoria a nivel subdérmico y una ausencia total a nivel intramuscular, ésta última se mantuvo así hasta los 90 días lo que indica una excelente tolerancia al material a nivel intramuscular, ya que tampoco se observaron CGMN. A nivel subdérmico mejoró la tolerancia ya que a los 90 días se observó una ausencia de inflamación. Esta respuesta inflamatoria bifásica también puede estar asociada a la propia respuesta del animal al material. A diferencia del material de hidroxiapatita que desapareció del tejido, se detectó una ausencia del material de hidroxiapatita con flúor en el 66.7% de los casos sólo a nivel subdérmico.

La evaluación del material de hidroxiapatita con plata y flúor fue el que menor ausencia de respuesta inflamatoria presentó, ya que a los 7, 14 y 30 días de evaluación, en ambos lugares (subdérmico e intramuscular), se presentó inflamación, que a diferencia de las observadas en los otros materiales, fue más intensa, lo que puede indicar una respuesta de menor tolerancia

al material. Esto puede estar asociado a la presencia de la plata y flúor juntos, ya que en el biomaterial con hidroxiapatita y flúor la respuesta inflamatoria no fue tan elevada. A nivel intramuscular se observó la presencia de CGMN a partir de los 7 días y se mantuvo variable su presencia a los 14 y 30 días de evaluación. Se observó una mejor tolerancia al material a los 90 días ya que a nivel subdérmico la ausencia de inflamación era del 100% y a nivel intramuscular se alcanzó el 66.7%. A los 90 días también se observó un cambio en cuanto a la presencia del material, pues a nivel subdérmico en el 66.7% de los casos y a nivel intramuscular en el 33.3% de los casos se encontró ausente, probablemente porque fue fagocitado debido a la presencia de CGMN en los periodos de evaluación anteriores. De acuerdo a D. Williams (57), la forma y presentación del material implantado influye mucho en la respuesta inflamatoria del tejido que entra en contacto con dicho material, para el caso de la hidroxiapatita con plata y flúor, se observó que era un polvo grueso, a pesar de haber sido molido en mortero y de haber reducido su tamaño de grano, esto pudo haber influido en la respuesta observada, además el material no se esterilizó previo a su colocación. En la síntesis de hidroxiapatita dopada con plata, la cantidad de plata es el elemento crítico que afecta sus propiedades (79), aunque la cantidad de plata y flúor con que se dopó la hidroxiapatita fue al 2% puede haber resultado elevada por la posible interacción plata-flúor, generando respuestas inflamatorias más importantes.

La elaboración de este material está pensada para aplicarse sobre la superficie del órgano dentario por lo que en realidad el material no estaría en contacto directo con tejido interno razón por la cual no representaría una situación de riesgo para los tejidos.

7. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que es posible obtener a través del método de combustión materiales de hidroxiapatita con y sin agentes dopantes, con tamaños de partícula dentro de la escala nanométrica. Las temperaturas utilizadas en el tratamiento térmico posterior a la combustión indican que se pueden obtener fases cristalinas, sin embargo es recomendable realizar ensayos a diferentes temperaturas con el fin de encontrar la temperatura ideal para obtener el máximo de estas fases cristalinas.

Por otra parte, las pruebas de biocompatibilidad realizadas a estos materiales a base de hidroxiapatita mostraron una respuesta favorable para las formulaciones de hidroxiapatita e hidroxiapatita con flúor en los 4 tiempos de evaluación (7, 14, 30 y 90 días), sin embargo los resultados obtenidos para el material de hidroxiapatita con plata y flúor no fueron tan favorables en los 3 primeros tiempos, ya que se presentaron respuestas inflamatorias importantes con presencia de CGMN en varios casos, sin embargo a los 90 días la respuesta inflamatoria casi desapareció, lo que sugiere que el material con el tiempo es mejor tolerado. Se puede concluir que los materiales de hidroxiapatita e hidroxiapatita con flúor presentaron mejor respuesta de biocompatibilidad que el material de hidroxiapatita con plata y flúor.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Lopes J.C.B. DMMGQ, Silva V.M.T.M., Quadros P.A.E., Monteiro F.J.M., Cunha P.J.G., Matues A.Y.P, inventor Production method for calcium phosphate nano-particles with high purity and their use. . Portugal2008
2. Gomes PJ, Silva VM, Quadros PA, Dias M, Lopes JCB. A highly reproducible continuous process for hydroxyapatite nanoparticles synthesis. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2009 9(6):3387-95.
3. Sun L, Chow LC. Preparation and properties of nano-sized calcium fluoride for dental applications. *Dental Materials Journal* 2008 24(1):111-6.
4. Li L, Pan H, Tao J, Xu X, Mao C, Gu X, et al. Repair of enamel by using hydroxyapatite nanoparticles as the building blocks. *Journal of Materials Chemistry* 2008;18(34):4079-84.
5. Caixia L, Zihua Y, Zhiyun L, Yunke W. Preparation and characterization of hydroxyapatite/chitosan sodium alginate composite materials.2006; 8(8).
6. Cüneyt T. Combustion synthesis of calcium phosphate bioceramic powder. *Journal of the European Ceramic Society* 2000 20 2389-04
7. Kundu B, Sinha MK, Mitra MK, Basu D. Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite ocular implant followed by an in vivo study in dogs. . *Bulletin of Materials Science*2004;27(2):133-40.
8. Leeuw NHd. Local ordering of hydroxy groups in hydroxyapatite. *Chemical Communications*2001 (17):1646-7.
9. Panda RN, Hsieh MF, Chung RJ, Chin TS. FTIR, XRD, SEM, and solid state NMR investigations of carbonate-coating hydroxyapatite nano-particles synthesized by hydroxide-gel technique. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 2003;64:193-9.
10. Elliot JC. Structure and chemistry of apatites and other calcium orthophosphates. : Elsevier Science; 1994
11. Xian W. *A Laboratory Course in Biomaterials*: CRC Press; 2009.
12. Rivero R. BMF, Rodríguez M.A. Influencia de los parámetros de síntesis en la obtención de hidroxiapatito por el método de combustión. . *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*2007 46(6):299-303.
13. Barberia LE. Caries. . In: España. EM, editor. *Odontopediatría*, 2da edición 2000. p. 173, 89-90.
14. Robinson C, Shore RC, Brookers SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham K. The chemistry of enamel caries. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2000;11 (4):481-95.
15. Coronel MEM, Ruíz JMD, Rico IMM, Félix CEF, Mejía ME. Demineralización-Remineralización del esmalte dental. . *Revista de la Asociación Dental Mexicana*2002;59(6):220-2.
16. Thylstrup A. FO. *Caries*, 1a edición. Barcelona: Doyma; 1986.
17. Cate AT. *Histología oral desarrollo, estructura y función*. . In: Ripano. EM, editor. *Caries dental Principios y procedimientos para el diagnóstico* Madrid, España. 2007 p. 37.
18. Echavarría JU. Adhesión del esmalte y dentina con adhesivos poliméricos. . In: Ripano. EM, editor. *Caries Dental, principios y procedimientos para el diagnóstico*, primera edición Madrid, España2007.
19. Fan Y, Sun Z, Moradian-Oldak J. Effect of Fluoride on the Morphology of Calcium Phosphate Crystals Grown on Acid-Etched Human Enamel. *Caries Research* 2009;43 132-6.
20. Enosta H. *Caries Dental, principios y procedimientos para el diagnóstico*. Ripano EM, editor. Madrid, España2007.
21. Silverstone L JN, Hardie J., Williams R. *Caries Dental, etiología, patología y prevención.: Manual Moderno.*; 1981.

-
22. Sitharaman B. Nanomaterials Handbook 2011.
 23. Mimani T, Patil KC. Solution combustion synthesis of nanoscale oxides and their composites. *Materials Physics and Mechanics* 2001;4:134-7.
 24. Best S, editor. *Ceramics for health*. . 2nd International Congress on Ceramics 2008. 2008.
 25. Malgorzata Lewandowska JS-K, Mariusz Andrzejczuk, Krzysztof J. Kurzydłowski. Nanomaterials in dental applications. *Solid State Phenomena* 2008 140 133-40.
 26. Fidancevska E, Ruseska G, Bossert J, Lin Y-M, Boccaccini AR. Fabrication and characterization of porous bioceramic composites based on hydroxyapatite and titania. *Materials Chemistry and Physics* 2007 103(1):95-100.
 27. Rameshbabu N, Kumar TSS, Prabhakar TG, Sastry VS, Murty KGK, Rao KP. Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite: synthesis and characterization. . *Journal of biomedical Materials Research Part A* 2006 80 (3):581-91
 28. Dorozhkin SV. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. . *Materials* 2009 2 (2):399-498
 29. Liu Q, Huang S, Matinlinna JP, Chen Z, Pan H. Insight into Biological Apatite: Physicochemical Properties and Preparation Approaches. *BioMed Research International* 2013 2013:13.
 30. Ciobanu CS, Massuyeau F, Constantin LV, Predoi D. Structural and physical properties of antibacterial Ag-doped nano-hydroxyapatite synthesized at 100°C. *Nanoscale Research Letters* 2011;6:1-8.
 31. Ghosh SK, Prakash A, Datta S, Roy SK, Basu D. Effect of fuel characteristics on synthesis of calcium hydroxyapatite by solution combustion route. *Bulletin of Material Science* 2010 2010;33(1):7-16.
 32. Vallet-Regi M, Navarrete DAA. *Biomimetic Nanoceramics in Clinical Use: From Materials to Applications*. Chemistry RSo, editor: RCS Publishing; 2008.
 33. LeGeros RZ. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. *Chemical Reviews* 2008 108 (11):4742-53
 34. Zakharov NA, Polunina IA, Polunin KE, Rakitina NM, Kochetkova EI, Sokolova NP, et al. Calcium Hydroxyapatite for Medical Applications. *Inorganic Materials* 2004 40 (6):641-8
 35. J.S.Al-Sanabani, Madfa AA, Al-Sanabani FA. Application of Calcium Phosphate Materials in Dentistry. *International Journal of Biomaterials* 2013.;2013 12
 36. Salimi MN, Bridson RH, Grover LM, Leeke GA. Effect of processing conditions on the formation of hydroxyapatite nanoparticles. *Powder Technology* 2012;218:109-18.
 37. Stanic V, Janackovic D, Dimitrijevic S, Tanaskovi SB, Mitric M, Pavlovic MS, et al. Synthesis of antimicrobial monophase silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering. *Applied Surface Science* 2011 257 4510-8.
 38. Kim TN, Feng QL, Kim JO, Wu J, Chen GV, Cui F-Z-. Antimicrobial effects of metal ions (Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) in hydroxyapatite. *Journal of Material Science: materials in medicine* 1998 9 (3):129-34
 39. Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiology Reviews* 2006 27(2-3):341-53
 40. Kwahara K, Tsuruda K, Morishita M, Uchida M. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dental Materials* 2000;16:452-5.
 41. Kolmas J, Groszyk E, Kwiatkowska-Rozycka D. Substituted Hydroxyapatites with Antibacterial Properties. *BioMed Research International* 2014 2014 15
 42. Percival SL, Bowler PG, Russell D. Bacterial resistance to silver in wound care. *Journal of Hospital Infection* 2005 60 (1):1-7
 43. Husheng J, Wensheng H, Liqiao W, Bingshe X, Xuguang L. The structures and antibacterial properties of nano-SiO₂ supported silver/zinc-silver materials. *Dental Materials Journal* 2008;24:244-9.

-
44. Balamurugan A, Balossier G, Laurent-Maquin D, Pina S. An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system. *Dental Materials Journal* 2008;24:1343-51.
 45. Bai X, More K, Rouleau CM, Rabiei A. Functionally graded hydroxyapatite coatings doped with antibacterial components. *Acta biomaterialia* 2010. ;6(2010):2264-73.
 46. Peetsch A, Greulich C, Braun D, Stroetges C, Rehage H, Siebers B, et al. Silver-doped calcium phosphate nanoparticles: Synthesis, characterization, and toxic effects toward mammalian and prokaryotic cells. *Colloids and surfaces: A Physicochemical and Engineering Aspects* 2013;102:724-9.
 47. Freund F, Knobel RM. Distribution of Fluorine in Hydroxyapatite studied by Infrared Spectroscopy. *Journal of Chemical Society, Dalton Transactions* 1977(11):1136-40.
 48. Farley JR, Wergedal JE, Baylink DJ. Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone-forming cells. *Science* 1983;222 330-2.
 49. Nayak AK. Hydroxyapatite Synthesis Methodologies: An Overview. *International Journal of Chem Tech Research* 2010;2(2):903-7.
 50. Chinarro E. MB, Martí D., González L., Villanueva E., Guinea D., Jurado J.R. Posibilidades del análisis de imagen para el estudio de la síntesis de materiales por combustión. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio* 2005;44(2):105-12.
 51. Singanahally T. Aruna, Mukasyan AS. Combustion synthesis and nanomaterials. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 2008;12(3-7):44-50.
 52. Patil KC, Aruna ST, Mimani T. Combustion synthesis: an update. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 2002 December 2002;6 (6):507-12.
 53. Tyagi AK. Combustion Synthesis: a soft chemical route for functional nano-ceramics. *Barc Newsletter* 2007(285):39-48.
 54. Martínez C, Moreno F. Biocompatibilidad en Fundamentos en Biomateriales de uso odontológico: aplicaciones en estética y cosmética dental.
 55. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *International Endodontic Journal* 2003 36 75-85
 56. Spector M. The concept of biocompatibility. *Comprehensive Biomaterials Elsevier* 2011
 57. Williams D. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008 29 2941-53
 58. Kirkpatrick CJ, Bittinger F, M.Wagner, Köhler H, Kooten TGv, Klein CL, et al. Current trends in biocompatibility testing. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 1998;212(2):75-84.
 59. Anderson JM, Miller KM. Biomaterial biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials* 1984 5 5-10
 60. Olsson B, Silwowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *Journal of Endodontics* 1981 7(8):355-69.
 61. [cited 2014]; Available from: www.ehu.es/imacris/PIE06/web/IR.htm.
 62. Skoog, Holler, Nieman. *Principios de análisis instrumental*, 5ta edición: Mc Graw Hill; 2001.
 63. ; Available from: sistemas.fciencias.unam.mx/fam/Infrarroja.pdf.
 64. Tema 8: Espectroscopía Fotoelectrónica de rayos X (XPS). [cited 2014]; Available from: <http://www.uco.es/~iq2sagrl/TranspTema8.pdf>.
 65. Marco JF. Espectroscopías de electrones para análisis de superficies. Available from: <http://magnetite.iqfr.csic.es/surflab/presentations/Analisis%20de%20superficies%20mediante%20AES,%20XPS%20y%20CEMS.pdf>.
 66. Atkins PW, Jones L. *Principios de Química, los caminos del descubrimiento*, 3a edición. . Buenos Aires. : Editorial Médica Panamericana. .
-

-
67. Bowen R, Hilal N. Basic principles of atomic force microscopy. . In: Elsevier. BH, editor. Atomic Force Microscopy in process engineering and introduction to AFM for improved processes and products 2009.
68. Eaton P, West P. Atomic Force Microscopy. : Oxford University Press; 2010
69. Microscopía electrónica: barrido y transmisión. Available from: <http://www.biologia.edu.ar/microscopia/meb.htm>.
70. Muñoz SG. Microscopía electrónica de transmisión y difracción de electrones de polímeros. Bul Soc Cat1991 XI:161-73.
71. Walters MA, Leung TC, Blumenthal NC, LeGeros RZ. A Raman and Infrared Spectroscopic Investigation of Biological Hydroxyapatite. Journal of Inorganic Biochemistry 1990;39:193-200.
72. Klee WE, Engel G. I.R. Spectra of the phosphate ions in various apatites. J Inorg Nucl Chem1970 32 1837-43.
73. Tanaka H, Tasuwaka A, Kandori K, Ishikawa T. Surface structure and properties of fluorinated calcium hydroxyapatite. Colloids and surfaces: A Physicochemical and Engineering Aspects 2002;204 (1-3):251-9.
74. Koutsopoulos S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. Journal of Biomedical Materials Research2002 62(4):600-12.
75. Markovic M, Fowler BO, Tung MS. Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. Journal of research of the National Institute of Standards and Technology 2004 109(6):553-68.
76. Rehman I, Bonfield W. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. . Journal of Material Science: materials in medicine 1997 8(1):1-4.
77. Web Mineral Data Base. Available from: [http://webmineral.com/data/Apatite-\(CaF\).shtml#U0lhH_I5Mz4](http://webmineral.com/data/Apatite-(CaF).shtml#U0lhH_I5Mz4) <[http://webmineral.com/data/Apatite-\(CaF\).shtml](http://webmineral.com/data/Apatite-(CaF).shtml)>.
78. Singh B, Dubey AK, Kumar S, Saha N, Basu B, Gupta R. In vitro biocompatibility and antimicrobial activity of wt chemically prepared $\text{Ca}_{10-x}\text{Ag}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ($0.0 \leq x \leq 0.5$) hydroxyapatites. Materials Science and Engineering C 2011;31:1320-9.
79. Oh KS, Kim KJ, Jeong YK, Park EK, Kim SY, Kwon JH, et al. Cytotoxicity and Antimicrobial Effect of Ag Doped Hydroxyapatite. Key Engineering Materials 2004;264-268:2107-10.