

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA INFORMÁTICA
INGENIERÍA DE LA SALUD

**Síntesis de hidroxiapatito en disoluciones
artificiales de agua de mar. Evaluación de sus
propiedades como biomaterial**

**Synthesis of hydroxyapatite in solutions of
artificial sea water. A preliminary assessment of its
properties as biomaterial**

Realizado por
María de la Cruz Torres Pérez
Tutorizado por
Pascual Olivera Pastor
Departamento
Química Inorgánica, Cristalografía y Mineralogía

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
MÁLAGA, Julio de 2017

Fecha defensa:

El Secretario del Tribunal

Resumen: En las últimas décadas el hidroxiapatito se ha convertido en uno de los biomateriales cerámicos más importante para aplicaciones biomédicas, principalmente en ortopedia y odontología, esto se debe a sus propiedades de biocompatibilidad y bioactividad derivadas de su composición química y variabilidad estructural, muy parecidas a la de los biominerales que se encuentran en los huesos y dientes. El hidroxiapatito se puede obtener a partir de huesos, pero hoy en día se sintetiza mediante diferentes procedimientos. Por ello, en este trabajo se investiga un método novedoso de obtención de carbonato-apatitos, análogos estructuralmente al biomaterial de hidroxiapatito, pero más parecidos en composición a los biominerales.

La metodología de síntesis utilizada consiste en una reacción química entre Ca(OH)_2 y H_3PO_4 a reflujo (temperatura de ebullición), en una disolución que contiene los principales iones presentes en el agua de mar, con varios grados de dilución (factor de dilución, $x= 0,125-1$). Estas condiciones garantizan una reproducibilidad de la síntesis de los biomateriales, con el menor gasto energético y la inclusión de iones presentes normalmente en los fluidos corporales. Mediante un proceso de dos etapas, síntesis y posterior purificación con disolución diluida de ácido etilendiaminotetraacético, se ha preparado, por primera vez, un biomaterial, cuya composición y, por tanto, su estructura, resultan coincidentes con las de un apatito de esmalte dental humano, como se deduce del análisis químico y la aplicación del método de Rietveld a los datos de difracción de rayos X. El estudio del material biomimético y de sus congéneres se completa con la determinación de la superficie BET, el análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido (SEM), caracterización por espectroscopía ATR-FTIR y la realización de un test de biocompatibilidad.

Palabras clave: Hidroxiapatito, carbonato-apatito dental, biomateriales cerámicos, biomimético, biocompatibilidad.

Abstract: This project deal with the preparation and full characterization of carbonate-apatites synthesized from artificial sea water solutions. The aim was to obtain biomaterials structurally analogous to the hydroxyapatite reference biomaterial, but trying to mimic the compositions generally found in biological apatites, i.e. containing the prevalent ions in body fluids, such as Mg^{2+} , Na^{+} and CO_3^{2-} , as minority components. Thus, an improvement in biocompatibility and bioactivity would be expected from these preparations.

The synthetic methodology used consists of a hydrothermal reaction, at *ca* 100°C, between $Ca(OH)_2$ y H_3PO_4 in the presence of the mayor ions present in seawater. Several degrees of dilution were applied (dilution factor, $X=0.125-1$). These conditions ensure an easy reproducibility of the synthesis of the calcium phosphate biomaterials, and the inclusion of ions normally present in body fluids, while maintaining the lowest possible energy expenditure. By means of a two stages-process, synthesis and further purification with a $5 \cdot 10^{-3}$ M EDTA solution, a biomaterial has been prepared that, for the first time, matches the composition of a human dental enamel apatite, as determined from the chemical analysis and the application of the Rietveld method to X-ray diffraction data. The study of the biomimetic material and its congeners was completed by measuring the BET surface, morphological analysis (SEM) and ATR-FTIR spectroscopy. Finally, a biocompatibility test was accomplished.

Keywords: Hydroxyapatite, dental carbonate-apatite, ceramic biomaterial, biomimetic, biocompatibility.

Índice

1. Introducción	Pág. 1
1.1 Biomateriales	Pág. 1
1.2 Biocerámicas	Pág. 2
- Fosfatos de calcio.....	Pág. 3
- Hidroxiapatita	Pág. 4
1.3 Fluidos Corporales Simulados.....	Pág. 5
1.4 Huesos y Dientes.....	Pág. 6
1.5 Aplicaciones médicas	Pág. 9
2. Motivación y objetivos	Pág. 10
2.1 Motivación	Pág. 10
2.2 Objetivos	Pág. 10
3. Materiales y métodos	Pág. 11
3.1 Materiales	Pág. 11
3.1.1 Componentes de la hidroxiapatita	Pág. 11
3.1.2 Componentes del agua de mar	Pág. 11
3.2 Métodos.....	Pág. 12
3.2.1 Experimento 1. Síntesis de HA en 150 ml de agua de mar	Pág. 13
3.2.2 Experimento 2. Síntesis de HA en 75 ml de agua de mar	Pág. 14
3.2.3 Experimento 3. Síntesis de HA en 37.5 ml de agua de mar	Pág. 15
3.2.4 Experimento 4. Síntesis de HA en 18.75 ml de agua de mar	Pág. 16
3.2.5 Experimento 5. Síntesis de HA con 2.07 g de H_3PO_4	Pág. 17
3.2.6 Procesos de optimización	Pág. 18
3.2.6.1 Tratamiento térmico.....	Pág. 18
3.2.6.2 Tratamiento de purificación	Pág. 18

4. Técnicas instrumentales	Pág. 20
4.1 Difracción de rayos X	Pág. 20
4.2 Microscopia electrónica de barrido	Pág. 21
4.3 Análisis termogravimétrico.....	Pág. 22
4.4 Espectrometría infrarroja	Pág. 23
4.5 Análisis de superficie	Pág. 24
4.6 Fluorescencia de rayos X.....	Pág. 25
5. Resultados y discusión	Pág. 27
5.1 Difracción de rayos X	Pág. 27
5.2 Análisis termogravimétrico.....	Pág. 36
5.3 Fluorescencia de rayos X.....	Pág. 38
5.4 Microscopia electrónica de barrido.....	Pág. 41
5.5 Análisis de superficie por adsorción de N ₂	Pág. 43
5.6 Espectrometría infrarroja	Pág. 46
5.7 Estudio de biocompatibilidad	Pág. 49
5.7.1 Estudio de la viabilidad celular mediante MTS.....	Pág. 52
5.7.2 Estudio mediante ensayos inmunofluorescencia	Pág. 53
5.7.3 Estudio de la adhesión y de la morfología mediante SEM	Pág. 55
6. Conclusiones	Pág. 58
8. Bibliografía	Pág. 59
Agradecimientos	Pág. 61

1. Introducción

Debido a la importancia que ha obtenido el hidroxiapatito en el ámbito médico, es deseable investigar nuevos métodos de preparación de este biomaterial para aplicaciones específicas que requieren adaptar su composición química –la cual suele depender de la metodología de síntesis-, su morfología, tamaño de partícula, porosidad, etc. Son numerosos los métodos descritos en la bibliografía, destacando sobre todo los procedimientos biomiméticos que simulan condiciones fisiológicas para favorecer la osteoconducción del material implantado. Así se ha preparado biomateriales de hidroxiapatito en fluidos corporales simulados (SBF) que son altamente biocompatibles y reabsorbibles.

1.1 Biomateriales

Concepto y definición

El término biomaterial hace referencia al conjunto de materiales destinados a aplicaciones biomédicas. Entre los muchos existentes, los compuestos basados en calcio (carbonatos y fosfatos) son los más importantes. La razón principal es que el hueso está constituido principalmente por fosfatos de calcio, entre los que destaca el hidroxiapatito (Duffo 2011, p.9).

En el año 1986, European Society for Biomaterials Consensus Conference definió a los biomateriales como: “Una sustancia o material, utilizado solo o en la fabricación de un dispositivo médico, diseñado para interactuar con los tejidos humanos en el monitoreo de funciones corporales o para tratar alguna condición patológica del cuerpo”.

Clasificación

Dependiendo de su composición química los biomateriales se pueden dividir en dos grandes grupos: Los biomateriales naturales y los sintéticos. Dentro de los sintéticos a su vez se clasifican en: Polímeros, metales, cerámicas y composites. Existen además biomateriales considerados medicamentos ya que contienen fármacos y otros llamados biomateriales híbridos que incluyen células vivas. La elección de un tipo u otro depende de la aplicación a la que va destinada (Sáenz 2004, p.36).

Propiedades

Debido a que los biomateriales son utilizados en medios biológicos y que en ocasiones sustituyen funciones de tejidos vivos, es fundamental que presenten las siguientes propiedades:

- Biocompatibilidad: Capacidad de un material de actuar de forma adecuada ante el medio biológico en el que se encuentra, es decir, de ser aceptado por el organismo y no provocar rechazo.
- No ser tóxico, dañino o producir molestias.
- Químicamente estable: Requiere que el material no presente degradación con el paso del tiempo.
- Tener un diseño adecuado al papel que va a desempeñar como biomaterial (Duffo 2011, p.9).

Hoy día se habla de tres generaciones de biomateriales: Con la primera se buscaba sustituir tejidos dañados, con la segunda se buscaba reparar tejidos y con la tercera el objetivo es llegar a regenerarlos (Vallet-Regí 2011, p.28).

1.2 Biocerámicas

Las biocerámicas son un subtipo de biomaterial obtenido a altas presiones y temperaturas. Se caracterizan por su dureza, alta resistencia a la compresión y, debido a sus enlaces iónicos o covalentes, tienen altas temperaturas de fusión. Estas características las hacen muy adecuadas para aplicaciones relacionadas con la reparación o reemplazo de tejido óseo y dientes (Sáenz 2004, p.35).

La mayor desventaja que presentan es la fragilidad. Aunque soportan cargas en compresión, fallan en tracción y flexión. Sin embargo, el mayor éxito de la aplicación depende de lograr o no una unión estable entre el biomaterial y el tejido conectivo (Duffo 2011, p.27). Es por eso que uno aspecto muy importante es la interacción existente en la interfase con el tejido vivo:

- Inertes: No interactúan con el medio biológico en el que se encuentran.
- Bioactivas: Pueden interactuar con el medio que les rodea
- Biodegradables o reabsorbibles: Son aquellas que pueden reemplazar o incorporarse al tejido (Vallet-Regí 2011, p.28).

Fosfatos de calcio

Los fosfatos de calcio son minerales formados por la combinación de iones de calcio (Ca^{2+}) con ortofosfato (PO_4^{3-}), principalmente pirofosfato ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$). Dependiendo del pH de precipitación del sólido, otros iones, tales como los protones (H^+) o los iones hidróxido (OH^-), suelen también formar parte de su composición. Sus propiedades químicas, físicas y estructurales son parecidas a las propiedades del hueso lo que le permite fijarse químicamente. El éxito de los implantes de fosfatos de calcio depende de varios factores además de la relación atómica Ca/P como son la porosidad y la estructura cristalina que tenga el material usado (Sáenz 2004, p.37).

Dependiendo de la fase en la que se encuentre el fosfato de calcio puede formar un compuesto u otro. A continuación, se muestra la tabla 1.1 con las distintas fases de los fosfatos.

Tabla 1.1. Fosfatos de calcio.

Símbolo	Nombre de la fase mineral	Fórmula	Definición química	Ca/P
ACP	-	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_{2n}\text{H}_2\text{O}$	Fosfato de calcio amorfo	-
MCP	-	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)\text{H}_2\text{O}$	Fosfato monocálcico hidratado	0.5
DCPD	Brucita	$\text{CaHPO}_4\text{H}_2\text{O}$	Fosfato dicálcico dihidratado	1.0
DCPA	Monenita	CaHPO_4	Fosfato dicálcico anhidro	1.0
TCP	β -Whitlockita*	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	β - Fosfato tricálcico	1.5
TCPM	Hilgenstokita	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tetracálcico monóxido	2.0
OCP	-	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato octacálcico pentahidratado	1.33
HA	Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Fosfato decacálcico dihidroxilo	1.67

*Actualmente el nombre de Whitlockita se reserva para el mineral $\text{Ca}_9(\text{Mg}, \text{Fe}^{\text{II}})\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_6$ y Merrillita para $\text{NaCa}_9(\text{Mg}, \text{Fe}^{\text{II}})(\text{PO}_4)_7$; Mientras que para la fórmula exacta de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ no se ha encontrado ningún mineral, sino que es un producto obtenido a alta temperatura ($\approx 800^\circ\text{C}$).

El fosfato de calcio más utilizado en la fabricación de implantes es la hidroxiapatita, por ser el compuesto más parecido al componente mineral del hueso y tener una relación Ca/P próxima a la de los biominerales.

Hidroxiapatita

Es un compuesto inorgánico que pertenece a la familia de la apatita, cuya fórmula es: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Los biominerales, con una composición similar a ésta, se encuentran en los huesos, en la dentina y en el esmalte dental representando el 99% del calcio y el 80% del fósforo existente en el cuerpo humano. La principal característica es que presenta osteoinducción, que se define como la capacidad para promover la formación de hueso.

Los componentes químicos fundamentales de la hidroxiapatita son el calcio y el fosfato, sin embargo, la hidroxiapatita natural contiene otros elementos en menor porcentaje como el cloro, sodio, carbonato y magnesio, los cuales son de gran importancia en la función remodeladora del hueso (García 2006, p.90).

En la tabla 1.2 se comparan las composiciones de los apatitos naturales y la de la hidroxiapatita sintética.

Tabla 1.2. Comparativa de elementos en peso.

Elemento (% peso)	Esmalte Dental	Dentina	Hueso	HA Sintética
Calcio	36.1	35.0	35.5	39.0
Fósforo	17.3	17.1	17.1	18.5
Dióxido de carbono	3.0	4.0	4.4	-
Magnesio	0.5	1.2	0.9	-
Sodio	0.2	0.2	1.1	-
Potasio	0.1	0.07	0.1	-
Cloro	0.3	0.03	0.1	-
Flúor	0.016	0.017	0.02	-
Azufre	0.1	0.2	0.6	-
Zinc	0.016	0.018	-	-
Relación Ca/P	1.62	1.59	1.71	1.67
Cristalinidad	70-75	33-37	33-37	80-100

La hidroxiapatita sintética es estequiométrica, con una relación Ca/P de 1.67, y solo contiene Ca, fosfato y OH^- . En cambio, los biominerales de fosfato de calcio contienen numerosos iones y su relación Ca/P es menor, además presentan una variabilidad en cuanto a su composición que está relacionada con el medio acuoso en que se forman. Es importante destacar que la relación Ca/P es indicativa de la estabilidad que presenta el compuesto (Sáenz 2004, p.38).

En referencia a su estructura, este fosfato cristaliza en el sistema hexagonal y presenta un grupo de simetría P63/m con valores de red $a = b = 9,432\text{\AA}$ y $c = 6,88\text{\AA}$, como se muestra en la figura 1.1 (UB, Materials).

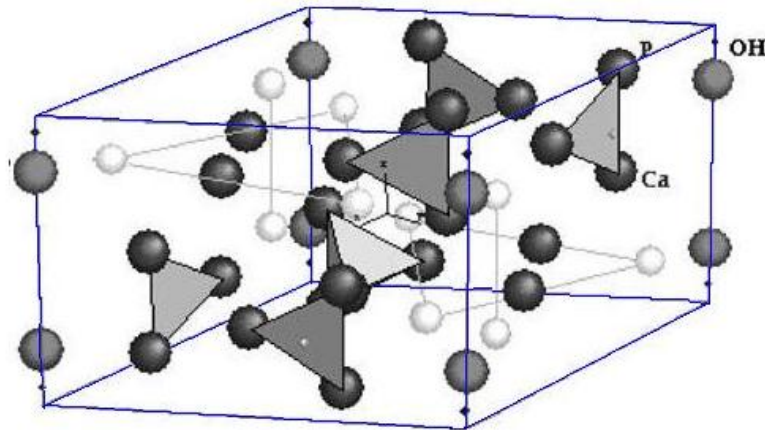


Figura 1.1. Celda unidad de hidroxiapatita.

El carácter iónico de la hidroxiapatita le otorga ser una cerámica refractaria, con un punto de fusión por encima de los 1500°C . Además, este carácter le proporciona la propiedad de insolubilidad y la capacidad de la sustitución de iones por otros de tamaño similar, dando lugar a diferentes tipos de hidroxiapatita, por ejemplo, una sustitución con flúor mejora la estabilidad química. La relación ideal Ca/P es 10/6 (1,6667) y su densidad es de $3,219\text{ g/cm}^3$ (Londoño 2006, p.110).

1.3 Fluido Corporal Simulado (SBF)

El fluido corporal simulado o plasma humano sintético se define como: “Una disolución con fuerza iónica similar a la del plasma de la sangre humana, que se mantiene en las mismas condiciones de pH y temperatura fisiológicas” (Kokubo 1991, p.156).

En el año 1991 Tadashi Kokubo introdujo este concepto y llevo a cabo un estudio sobre la formación de hidroxiapatita en fluidos corporales simulados. Una vez finalizado, estableció que el requisito principal para que un biomaterial pueda crear un enlace directo con el hueso es la formación en su superficie de una capa de apatita similar a la del hueso después de ser implantado en el cuerpo humano. Según Kokubo, esta formación puede ser reproducida gracias a las concentraciones de iones existentes, muy parecida a las del plasma sanguíneo humano (Tabla 3) (Kokubo 2006). Las propiedades que obtiene la hidroxiapatita son las que determinan la viabilidad y proliferación celular.

El proceso de formación de la apatita requiere consumo de iones de calcio y fósforo de los alrededores del fluido corporal. El fosfato de calcio incorpora iones OH^- , CO_3^{2-} , Na^+ , K^+ y Mg^{2+} de la disolución simulada hasta que cristaliza en un carbonato hidroxiapatita de composición variable (Vallés 2008).

Tabla 1.3. Composición iónica del plasma.

Composición Plasma	g/L	M (Molar)
Sodio	3.2	0.142
Potasio	0.195	0.005
Magnesio	0.036	0.0015
Calcio	0.1	0.0025
Cloruro	3.65	0.103
Bicarbonato	1.64	0.027
Sulfato	0.048	0.0005

Los ensayos en fluidos corporales simulados proporcionan un método biomimético que no requiere un equipo especial, no es costoso y, además, puede ser utilizado como indicador de la capacidad del material de interactuar con los tejidos vivos (bioactividad).

1.4 Huesos y dientes

Huesos

Los huesos son piezas rígidas y duras que en conjunto forman el esqueleto de los vertebrados. Están constituidos principalmente por tejido óseo y presentan una composición química de: 25% agua, 45% materia inorgánica (fosfatos y carbonato de calcio) y 30% materia orgánica (células y proteínas). La parte inorgánica supone aproximadamente el 65% del peso óseo, mientras que la parte orgánica supone el 35%. Los minerales de los huesos no son componentes inertes, sino que realizan intercambios y reemplazos con los componentes orgánicos en un proceso denominado remodelación ósea.

Materia orgánica

Los principales componentes orgánicos de la matriz ósea son el colágeno tipo I y la osteonectina, una fosfoproteína que puede interactuar tanto con el colágeno como con las sales inorgánicas. Las principales células presentes en el tejido óseo son:

- Osteoblastos: Responsables de sintetizar y secretar la parte orgánica de la matriz ósea durante su formación.
- Osteocitos: Responsables del mantenimiento de la matriz ósea.
- Osteoclasto: Responsables de la reabsorción del tejido óseo. Se encargan del proceso de remodelación de los huesos.

Materia inorgánica

La matriz ósea contiene una gran cantidad de sales minerales en forma cristalizada, principalmente hidroxapatita y carbonato de calcio. Además, en pequeñas cantidades encontramos sulfatos, fluoruros e hidróxido de magnesio. Todas estas sales se encuentran depositadas en una red de fibras formada por las fibras de colágeno. El proceso por el cual se depositan y cristalizan se denomina calcificación.

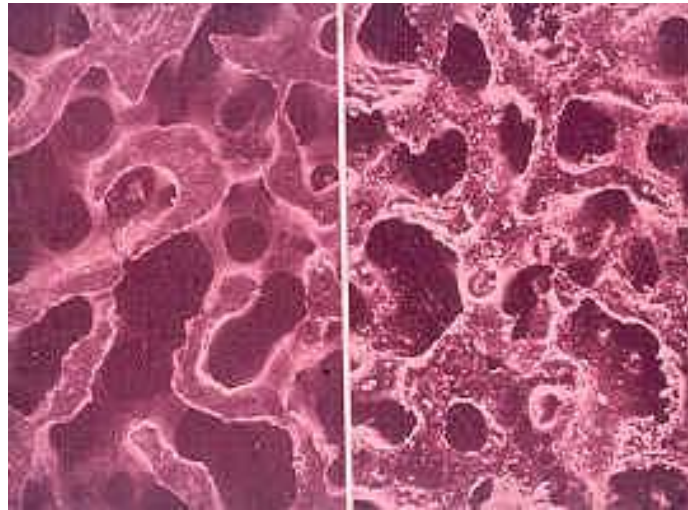


Figura 1.2. Corte histológico del hueso y de la hidroxapatita.

A la izquierda de la figura 1.2 se muestra un corte histológico de un hueso esponjoso humano, y a la derecha un corte histológico de hidroxapatita. Como se puede apreciar muestran una gran similitud a nivel estructural lo que le confiere a la hidroxapatita una propiedad excelente para ser utilizada como biomaterial en aplicaciones relacionadas con el tejido óseo.

Dientes

Son piezas duras y rígidas dispuestas en los maxilares de la boca. Los dientes están constituidos por tres tejidos duros: El esmalte, la dentina y el cemento y por un tejido blando: La pulpa dentaria.

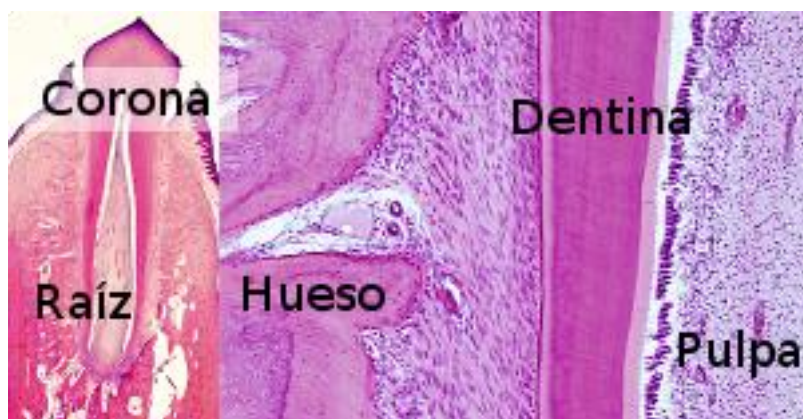


Figura 1.3. Corte histológico del diente.

Esmalte

Es la parte más dura y mineralizada del diente. Su composición es de un 95% de hidroxiapatita, un 4% de agua y un 1% de material orgánico. En la parte orgánica se encuentran proteínas con un alto porcentaje de serina, ácido glutámico y glicina.

La composición química que presenta la hidroxiapatita del esmalte dental es: $(Ca,Mg,Na)_{10-x}[(PO_4)_{6-x}(CO_3)_x](OH)_{2-x}$, característica de las apatitas que se encuentran presentes en depósitos biológicos con altas concentraciones de fosfatos.

Dentina

Constituye la mayor parte del diente. Su composición es de un 70% de minerales (hidroxiapatita y fosfato cálcico), un 20% de material orgánico y 10% de agua. Está unida a la pulpa dentaria cuyas células especializadas, los odontoblastos, la elaboran.

Cemento

Cubre la raíz del diente. Su composición es de un 45% de hidroxiapatita, un 33% de proteínas (colágeno) y un 22% de agua. La función del cemento es proporcionar estabilidad al diente.

Pulpa

Está compuesta por una matriz orgánica que contiene fibras de colágeno de tipo I y III dispuestas irregularmente, además de vasos sanguíneos y nervios. El papel principal de la pulpa es formar la dentina a través de los odontoblastos.

Tabla 1.4. Composición química promedio (%) del tejido dentario.

Componentes	Esmalte*	Cemento	Dentina*
Agua	1.5	32.09	10.0
Materia Orgánica	1.5	22.09	20.0
Materia inorgánica	97	45,82	70
Calcio	36.5	35.5	35.1
Fósforo	17.7	17.5	16.2
Carbonato, CO_3^{2-}	3.5	4.4	5.6

* (Legeros y Ben-Nissan 2014, p.6)

1.5 Aplicaciones médicas

La hidroxiapatita tiene varias aplicaciones en el ámbito médico. Principalmente se utiliza como relleno de cavidades en dientes y como recubrimiento en superficies de prótesis, pero además, puede ser utilizada para desempeñar otras funciones como reemplazar partes del hueso, y como vehículo de liberación de medicamentos.

Recubrimiento

La hidroxiapatita como material de recubrimiento es utilizada en prótesis metálicas para acelerar el proceso de formación ósea. La capa de recubrimiento inorgánico actúa mediante procesos convencionales de señalización, en los cuales se produce la adsorción de proteínas de la matriz extracelular, la proliferación y diferenciación de los osteoblastos. Una vez producida la diferenciación, se empieza a crear matriz ósea y ésta crece desde la superficie del implante hacia el hueso. Finalmente, la matriz ósea madura creando la unión ósea entre el implante y el hueso sin interposición de tejido fibroso (Faig-Martí 2008, pp.115-116).

Además, tiene otros beneficios que mejoran el comportamiento del metal ante el medio fisiológico, evitando o reduciendo la liberación de iones al medio, disminuyendo así la corrosión (Faig-Martí 2008, p.114). Las principales características que debe tener la capa de recubrimiento son:

- Estabilidad química: No debe disolverse al estar en contacto con el medio biológico, ni reaccionar con el metal sobre el que se ha depositado.
- Estabilidad mecánica: Debe adherirse bien a la superficie y ésta debe ser homogénea en toda la estructura.

Relleno

La hidroxiapatita como material de relleno se usa en casi todos los aspectos de la cirugía ortopédica reconstructiva, y abarcan desde el tratamiento de fracturas hasta técnicas en cirugía tumoral. La estructura micro y macroporosa de la hidroxiapatita le permite ser reabsorbida y reemplazada por el hueso durante el proceso de integración de dispositivos biomédicos.

En cuanto al ámbito odontológico, el proceso de integración consiste en una reabsorción lenta que deja una reserva de fosfato y calcio disponible para los procesos de biomineralización y regeneración ósea (Jepsen 2008). La hidroxiapatita estimula la proliferación celular activando el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la MAP kinasa (ERK1/2) y la vía de la proteína kinasa B (Kasaj 2008).

2. Motivación y objetivos

2.1 Motivación

El uso de la hidroxiapatita como biomaterial se ha convertido en un campo de desarrollo e investigación muy activo, es por eso que este trabajo propone e investiga sobre un nuevo método de obtención de biomateriales a partir de hidroxiapatita con el fin de aportar un proceso novedoso de síntesis.

2.2 Objetivos

El objetivo de este trabajo es preparar nuevos materiales a base de hidroxiapatito en medios acuosos artificiales de agua de mar, con la intención de incorporar en los sólidos iones normalmente presentes en los fluidos corporales, simulando, con ello, procesos biomiméticos de formación de biominerales. Las fases de las que consta el trabajo son:

- Síntesis hidrotermal de hidroxiapatita a partir de disoluciones de agua de mar artificiales con concentración iónica variable.
- Caracterización de los materiales obtenidos mediante difracción de rayos X, análisis químico, espectroscopía infrarroja (ATR) y microscopía SEM.
- Determinación y cuantificación de fases cristalinas.
- Análisis térmogravimétrico y textural de los sólidos.
- Estudio de biocompatibilidad.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Componentes de la hidroxiapatita

Para la síntesis de hidroxiapatita se ha utilizado los siguientes productos:

- Ácido Fosfórico 85%: H_3PO_4 , WWR Chemicals.
 - Densidad = 1.7g/cm^3 .
 - Molaridad = 14.74 M.
- Hidróxido de calcio: $\text{Ca}(\text{OH})_2$, WWR Chemicals.

3.1.2 Componentes del agua de mar

Para la preparación de agua de mar artificial se utilizó como referencia la composición iónica del agua de mar natural que se muestra en la tabla 2.1, ésta recoge las concentraciones en moles y los gramos por litro de cada componente.

Tabla 2.1. Componentes del agua de mar natural.

Composición	g/L	moles/L
Sodio (Na^+)	10.7	0.46
Magnesio (Mg^{2+})	1.3	0.054
Calcio (Ca^{2+})	0.42	0.010
Potasio (K^+)	0.39	0.01
Cloruro (Cl^-)	19.25	0.54
Sulfato (SO_4^{2-})	2.7	0.028
Bicarbonato (HCO_3^-)	0.14	0.002

En base a esta composición, se ha utilizado para la síntesis los siguientes productos:

- Cloruro sódico: NaCl .
- Cloruro de magnesio: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Cloruro de calcio: CaCl_2
- Sulfato de sodio: Na_2SO_4 , Merck.
- Hidróxido de potasio: KOH
- Bicarbonato de Sodio (Químicamente puro): NaHCO_3 , Probus.

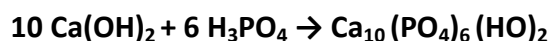
Con el fin de obtener la misma concentración de iones y la misma cantidad de cada componente existente en el agua de mar natural, se realizaron los cálculos para determinar los g/L necesarios de cada una de las sales. La composición del agua de mar artificial viene recogida en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Componentes del agua de mar artificial.

Sales	Moles	Masa Molar (g/mol)	g/L	g de Cl-
NaCl	0.41	58.45	23.9	14.5
Na ₂ SO ₄	0.028	142.06	3.97	-
NaHCO ₃	0.02	84.01	1.68	-
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.054	203.28	10.97	3.83
CaCl ₂	0.01	110.97	1.10	0.7
KOH	0.01	56.00	0.56	-

3.2 Métodos

La metodología de síntesis consiste en una reacción química entre Ca(OH)₂ y H₃PO₄ a reflujo (temperatura de ebullición) en una disolución que contiene los principales iones presentes en el agua de mar (magnesio, calcio, sodio, potasio, cloruro, hidrogeno, carbonato y sulfato) preparada artificialmente y manteniendo su proporción relativa, pero variando su concentración en cada experimento. Estas condiciones garantizan una reproducibilidad de la síntesis del material con el menor gasto energético posible. La reacción química producida en la síntesis es:



El objetivo de cada experimento es la síntesis de 3 g de hidroxiapatita. La proporción de ácido fosfórico utilizada es menor a la cantidad teórica obtenida en los cálculos, con el fin de hacer el medio más base y favorecer la síntesis. Además, se sabe que la hidroxiapatita estequiométrica no es la que se encuentra en el cuerpo humano, sino que suele tener una relación Ca/P distinta a 1.67.

3.2.1 Experimento 1: Síntesis de HA en 150 ml de agua de mar

Componentes

Los componentes necesarios para este experimento son:

- Agua de mar artificial: 150 ml.
- Hidróxido de calcio: 2.21 g.
- Ácido fosfórico: 0.68 g.

Procedimiento

Fase 1: Reacción química

En un matraz con capacidad para 250 ml disolvemos 2.21 g de hidróxido de calcio en 150 ml de agua de mar. Esta disolución se lleva a reflujo mediante una placa con una temperatura de entre 120°C y 130°C y una agitación de 700 rpm.

Una vez a reflujo, se añade 0.68 g de ácido fosfórico, es importante que la adición sea lenta para evitar la formación de fases, ya que se añade un ácido a un medio base. Se incorpora 7 gotas cada 5 minutos con ayuda de una pipeta, aproximadamente durante 2 horas (hasta terminar la cantidad establecida). La disolución se deja a reflujo a la misma temperatura y agitación durante 24 horas.

Fase 2: Separación y lavado

En esta fase se requiere la utilización de la centrifugadora, ésta pone en rotación las muestras para separar por fuerza rotatoria la parte sólida de la parte líquida en función de su densidad. La muestra se centrifuga a 8000 rpm durante 4 min.

Una vez separada la parte líquida de la parte sólida, medimos el pH para comprobar que no es ácido y que se dan las condiciones necesarias para la síntesis. El pH fue de 8.6 (pH base). Por otro lado, la parte sólida se hace pasar por un proceso de lavado volviéndola a centrifugar junto con agua destilada en dos ocasiones.

Fase 3: Secado

La muestra obtenida en la fase anterior se somete a un proceso de secado en una estufa durante 24 horas a una temperatura de 60°C.

Fase 4: Preparación de la muestra

Para poder realizar los análisis se debe preparar la muestra en polvo. Tras el secado, molturamos la muestra mediante el uso de un mortero. Finalmente se guarda y se etiqueta con el nombre de referencia: Muestra 4.

3.2.2 Experimento 2: Síntesis de HA en 75 ml de agua de mar y 75 ml de agua destilada

En este experimento la solución de agua de mar artificial es diluida a 1/2, con una relación de 50% agua de mar artificial y 50% agua destilada.

Componentes

Los componentes necesarios para este experimento son:

- Agua de mar artificial: 75 ml.
- Agua destilada: 75 ml.
- Hidróxido de calcio: 2.21 g.
- Ácido fosfórico: 0.68 g.

Procedimiento

Fase 1: Reacción química

Se disuelve 2.21 g de hidróxido de calcio en 75 ml de agua de mar artificial junto con 75 ml de agua destilada. Esta disolución se lleva a reflujo mediante una placa con una temperatura de entre 120°C y 130°C y una agitación de 700 rpm.

Una vez esté a reflujo, se va añadiendo lentamente 0.68 g de ácido fosfórico. Se incorpora 7 gotas de ácido fosfórico diluido en 10 ml de agua destilada cada 5 minutos, aproximadamente durante 2 horas. La disolución se deja a reflujo con la misma temperatura y agitación durante un mínimo de 24 horas.

Fase 2: Separación y lavado

El proceso de separación y lavado se realiza en las mismas condiciones que en la fase 2 descrita en el experimento 1.

Fase 3: Secado

El proceso de secado se realiza en las mismas condiciones que en la fase 3 descrita en el experimento 1.

Fase 4: Preparación de la muestra.

La muestra en polvo se guarda y se etiqueta con la referencia: Muestra 3.

3.2.3 Experimento 3: Síntesis de HA en 37.5 ml de agua de mar y 112.5 ml de agua destilada

En este experimento la solución de agua de mar es diluida a 1/4, con una relación de 25% agua de mar y 75% agua destilada.

Componentes

Los componentes necesarios para este experimento son:

- Agua de mar artificial: 37.5 ml.
- Agua destilada: 112.5 ml.
- Hidróxido de calcio: 2.21 g.
- Ácido fosfórico: 0.68 g.

Procedimiento

Fase 1: Síntesis química

Se disuelve 2.21 g de hidróxido de calcio en 37.5 ml de agua de mar artificial junto con 112.5 ml de agua destilada. Esta disolución se lleva a reflujo mediante una placa con una temperatura de entre 120°C y 130°C y una agitación de 700 rpm.

Una vez esté a reflujo, se va añadiendo lentamente 0.68 g de ácido fosfórico. Se incorpora 7 gotas de ácido fosfórico diluido en 10 ml de agua destilada cada 5 minutos, aproximadamente durante 2 horas. La disolución se deja a reflujo con la misma temperatura y agitación durante un mínimo de 24 horas.

Fase 2: Separación y lavado

El proceso de separación y lavado se realiza en las mismas condiciones que en la fase 2 descrita en el experimento 1.

Fase 3: Secado

El proceso de secado se realiza en las mismas condiciones que en la fase 3 descrita en el experimento 1.

Fase 4: Preparación de la muestra.

La muestra en polvo se guarda y se etiqueta con la referencia: Muestra 2.

3.2.4 Experimento 4: Síntesis de HA en 18.75 ml de agua de mar y 131.25 ml de agua destilada

En este experimento la solución de agua de mar es diluida a 1/8, con una relación de 12.5% agua de mar artificial y 87.5% de agua destilada.

Componentes

Los componentes necesarios para este experimento son:

- Agua de mar artificial: 18.75 ml.
- Agua destilada: 131.25 ml.
- Hidróxido de calcio: 2.21 g.
- Ácido fosfórico: 0.68 g.

Procedimiento

Fase 1: Síntesis química

Se disuelve 2.21 g de hidróxido de calcio en 18.75 ml de agua de mar artificial junto con 131.25 ml de agua destilada. Esta disolución se lleva a reflujo mediante una placa con una temperatura de entre 120°C y 130°C y una agitación de 700 rpm.

Una vez esté a reflujo, se va añadiendo lentamente 0.68 g de ácido fosfórico. Se incorpora 7 gotas de ácido fosfórico diluido en 10 ml de agua destilada cada 5 minutos, aproximadamente durante 2 horas. La disolución se deja a reflujo con la misma temperatura y agitación durante un mínimo de 24 horas.

Fase 2: Separación

El proceso de separación se realiza en las mismas condiciones que en la fase 2 descrita en el experimento 1.

Fase 3: Secado

El proceso de secado se realiza en las mismas condiciones que en la fase 3 descrita en el experimento 1.

Fase 4: Preparación de la muestra

La muestra en polvo se guarda y se etiqueta con la referencia: Muestra 1.

3.2.5 Experimento 5: Síntesis de HA en 150 ml de agua de mar con 2.07 g de ácido fosfórico

Tras realizar el análisis de difracción de rayos X se observó que la mejor síntesis se produjo en el experimento 1, el cual es el que presenta mayor porcentaje de agua de mar artificial (100%). El experimento 5 consiste en realizar la síntesis con la misma cantidad de agua de mar artificial y la misma cantidad de hidróxido de calcio que en el experimento 1, pero añadir la cantidad teórica de ácido fosfórico obtenida en los cálculos correspondientes, es decir, 2.07 g.

Componentes

Los componentes necesarios para este experimento son:

- Agua de mar artificial: 150 ml.
- Hidróxido de calcio: 2.21 g.
- Ácido fosfórico: 2.07 g.

Procedimiento

Fase 1: Síntesis química

Se disuelve 2.21 g de hidróxido de calcio en 150 ml de agua de mar artificial. Esta disolución se lleva a reflujo mediante una placa con una temperatura de entre 120°C y 130°C y una agitación de 700 rpm.

Una vez esté a reflujo, se va añadiendo lentamente 2.07 g de ácido fosfórico. Se incorpora 7 gotas de ácido fosfórico diluido en 10 ml de agua destilada cada 5 minutos, aproximadamente durante 2 horas. La disolución se deja a reflujo con la misma temperatura y agitación durante un mínimo de 24 horas.

Fase 2: Separación y lavado

El proceso de separación y lavado se realiza en las mismas condiciones que en la fase 2 descrita en el experimento 1.

Fase 3: Secado

El proceso de secado se realiza en las mismas condiciones que en la fase 3 descrita en el experimento 1.

Fase 4: Preparación de la muestra.

La muestra en polvo se guarda y se etiqueta con la referencia: Muestra 5A.

3.2.6 Procesos de optimización

3.2.6.1 Tratamiento térmico

Las muestras obtenidas en los experimentos 1, 2, 3 y 4 mostraron en el análisis de difracción de rayos X porcentajes altos de hidróxido de magnesio (Brucita) que indicaban que éste no había reaccionado. Como se sabe que la brucita tiene naturaleza reactiva y que reacciona con la parte amorfa que contiene la muestra, se propuso un tratamiento térmico con el fin de aumentar la fase cristalina. Por ello, las muestras fueron tratadas a una temperatura de 150°C en una estufa durante 24 horas.

Cada una de ellas fue etiquetada con la correspondiente referencia: Muestra 4 150C, Muestra 3 150C, Muestra 2 150C y Muestra 1 150C.

3.2.6.2 Tratamiento de purificación

La muestra 5A tras ser analizada por difracción de rayos X, mostró un porcentaje alto de halita y calcita. Con el fin de eliminar estos componentes y aumentar la síntesis de hidroxiapatita se realizó un tratamiento de purificación mediante el cual se trató la muestra con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), cuya composición química es $C_{10}H_{16}N_2O_8$. El EDTA es un agente quelante que muestra gran afinidad por los cationes de calcio, lo que disolver otras fases secundarias de calcio presentes.

Componentes

Los componentes necesarios para este experimento son:

- EDTA: 0.146 g (PM: 292.24 g/mol).
- Agua destilada: 100 ml.
- Muestra 5A en polvo: 1 g.

Procedimiento

Fase 1: Mezcla con EDTA

Se disuelve 0.146 g de H_4 EDTA en 100 ml de agua destilada. Cuando el ácido está disuelto completamente, se incorpora a la disolución 1 g de hidroxiapatita correspondiente a la muestra 5A que tenemos en polvo. Por último, la disolución se deja en agitación a 700 rpm durante 1 hora.

Fase 2: Separación y lavado

La disolución obtenida en la fase anterior se centrifuga a 8000 rpm durante 4 minutos con el fin de separar la parte sólida de la parte líquida.

La parte sólida se hace pasar por un proceso de lavado volviéndola a centrifugar junto con agua destilada en dos ocasiones. Este proceso es muy importante ya que con el lavado se consigue eliminar la halita.

Fase 3: Secado

La muestra obtenida en la fase anterior se somete a un proceso de secado en una estufa durante 24 horas a una temperatura de 60°C.

Fase 4: Preparación de la muestra

Para poder realizar los análisis se debe preparar la muestra en polvo. Tras el secado, molturamos la muestra y la reducimos a polvo. Finalmente se guarda y se etiqueta con la referencia: Muestra 5B.

En la siguiente tabla (Tabla 2.3) se recoge las muestras que van a ser analizadas ordenadas según la concentración de agua de mar, además se indica la relación Ca/P de cada una:

Tabla 2.3. Nomenclatura de muestras

Muestra	Factor de dilución del agua de mar preparada, $0 < x < 1$	Relación $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{H}_3\text{PO}_4$ utilizada
1	0.125	10/3
2	0.25	10/3
3	0.50	10/3
4	1.00	10/3
5A	1.00	10/6
5B*	1.00	10/6

*La muestra 5B es la misma que la 5A, pero sometida a un tratamiento de purificación con disolución diluida de EDTA (ácido etilendiamino tetraacético).

4. Técnicas instrumentales

4.1 Difracción de rayos X

La difracción de rayos X (DRX) es una técnica no destructiva que permite la identificación de estructuras cristalinas de una muestra. Ofrece un análisis cualitativo y cuantitativo de las fases que presentan los materiales.

Descripción

Los rayos X son una forma de radiación electromagnética de elevada energía y pequeña longitud de onda. Cuando un haz de rayos X incide en un material sólido, parte se dispersa en todas direcciones a causa de los electrones asociados a los átomos o a los iones que se encuentran en el trayecto, pero el resto del haz puede dar lugar al fenómeno de difracción de rayos X, que tiene lugar si existe una disposición ordenada de átomos y si se cumplen las condiciones que vienen dadas por la Ley de Bragg.

La Ley de Bragg relaciona la longitud de onda y la distancia interatómica con el ángulo de incidencia del haz difractado. Este proceso viene descrito por:

$$n\lambda = 2d \text{ Sen}\theta$$

Donde n es el orden de reflexión, $\text{Sen}\theta$ es el ángulo formado entre la superficie de la muestra y la radiación incidente, λ es la longitud de onda y d la distancia interplanar.

Equipo experimental

El equipo requerido para este análisis es el difractómetro, concretamente se ha utilizado el Difractómetro Automático PANalytical EMPYREAN con detector de PIXcel.



Figura 4.1. Difractómetro Automático PANalytical EMPYREAN.

El refinamiento estructural se ha llevado a cabo a través del método Rietvel, el cual consiste en ajustar el difractograma experimental con uno calculado. Durante el refinamiento, los parámetros atómicos y los globales, se refinan en un procedimiento de mínimos cuadrados no lineales hasta que el difractograma calculado, basándose en el modelo estructural, consiga el mejor ajuste.

El software utilizado para la difracción de Rx ha sido el HighScore Plus que permite el ajuste de varios parámetros para hacerlos coincidir y determinar la composición de las fases de la muestra, la orientación preferente, los parámetros de red y la cantidad de amorfo. Los principales parámetros ajustados para la fase cualitativa son: Background, Granularity y Bending factor. Es necesario seleccionar los elementos que están presentes en la muestra para que se busquen mediante la ejecución de Search and Match y una vez encontrados los picos, se analiza si corresponden o no. Finalmente para cuantificar se selecciona el método Rietveld que al ejecutarse cuantifica las fases encontradas en el procedimiento anterior, este análisis fue realizado en el modo semicuantitativo.

4.2 Microscopia electrónica de barrido

Es una técnica de microscopia que utiliza el microscopio electrónico de barrido (SEM) para visualizar imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando la interacción electrón-materia.

Descripción

El procedimiento se basa en el principio de la microscopia óptica en el que se sustituye un haz de luz por un haz de electrones (hasta 100 Å de resolución) y se hace incidir sobre la muestra previamente recubierta por una fina capa de oro si ésta no es conductora. En el barrido se generan electrones secundarios; Retrodispersados y de Auger, y un conjunto de electroimanes mide la cantidad e intensidad de los electrones devueltos por la muestra. A partir de este procedimiento se puede hacer una reconstrucción en 3D.

Además de la visualización de la superficie, se realizó el microanálisis por EDS mediante el detector de rayos X. Este detector recibe los rayos X procedentes de cada uno de los puntos de la superficie sobre los que pasa el haz de electrones. A diferencia de los electrones Auger de baja energía, los rayos X proporcionan información analítica de un volumen considerable de la muestra.

Equipo experimental

El equipo requerido para esta técnica es el microscopio, concretamente se ha utilizado el Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-840.



Figura 4.2 Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-840.

4.3 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico es una técnica que caracteriza los materiales que presentan pérdida o ganancia de peso debido a la descomposición, oxidación o deshidratación.

Descripción

La técnica mide la cantidad y rapidez del cambio de peso en una muestra en función de la temperatura y/o del tiempo en una atmósfera controlada. Puede realizar medidas para determinar la composición de la muestra, la proporción de la cantidad de materia orgánica e inorgánica, predecir su estabilidad y evaluar la pureza. El equipo está formado por una balanza analítica de alta sensibilidad, un horno, en el que se calienta la muestra a una velocidad controlada y un sistema de gas que proporciona la atmósfera deseada.

Equipo

El equipo requerido para este análisis es el analizador termogravimétrico, concretamente se han utilizado el Analizador SDT-Q600 de la marca TA Instruments y el Analizador METTLER TOLEDO modelo TGA/DSC 1.



Figura 4.3 Analizador SDT-Q600.



Figura 4.4 METTLER TOLEDO.

Para el análisis realizado en el departamento de química, se emplearon las siguientes condiciones: Muestra a temperatura ambiente, la cual se va incrementando hasta alcanzar los 1000°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

Para el análisis realizado en los servicios centrales se emplearon las siguientes condiciones: Muestra en crisol de Al₂O₃ de 70 µl en el intervalo de temperaturas 30-900°C, con un flujo de aire de 50 ml/min y una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

4.4 Espectrometría infrarroja (ATR)

La espectrometría infrarroja es un tipo de espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético. Esta técnica nos permite identificar compuestos e investigar la composición de una muestra.

Descripción

La región infrarroja se divide en tres regiones: Infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio (MIR) e infrarrojo lejano (FIR). En este caso se ha utilizado el MIR que permite convertir esta técnica en una técnica cuantitativa. La técnica de transformada de Fourier, mediante operaciones matemáticas, convierte un espectro en dominio del tiempo a un espectro de frecuencia, obteniendo espectros de forma precisa y con relaciones Señal/Ruido elevadas.

El modo Reflectancia Total Atenuada (ATR) utilizado es un modo de muestreo en el que el haz IR se proyecta en un cristal con alto índice de refracción. El haz se refleja en la cara interna del cristal y crea una onda que penetra en la muestra. Parte de la energía de la onda es absorbida y la radiación reflejada (con la información química de la muestra) es conducida al detector. Este método permite medir las muestras sólidas casi sin preparación de las mismas.

Equipo

El equipo requerido para este análisis es el espectrómetro, concretamente se ha utilizado el Espectrómetro Vertex 70 de Bruker. En este caso se ha trabajado por ATR, para lo que se ha utilizado un accesorio Golden Gate Single Reflection Diamond ATR System.



Figura 4.5. Espectrómetro Vertex 70.

4.5 Análisis de superficie (BET)

El análisis de superficie mediante el método BET es una técnica que permite caracterizar la superficie porosa de los sólidos y realizar un análisis de quimisorción (interacción química entre adsorbato y adsorbente).

Descripción

El análisis permite determinar varios parámetros de la muestra: El área de superficie tanto externa como interna, el volumen y la distribución de los poros. La estructura porosa se analiza mediante isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno a 77K que se desarrollan variando la presión relativa (P/P_0) del gas a una temperatura constante y registrando el volumen de gas adsorbido en la superficie del sólido.

Equipo

El equipo requerido para este análisis es el Equipo Automático MICROMERITICS: ASAP 2020 dotado de un equipamiento auxiliar y un software avanzado en tareas para el estudio físico de la porosimetría.



Figura 4.6. MICROMERITICS: ASAP 2020.

4.6 Fluorescencia de rayos X (XRF)

La fluorescencia de rayos X es una técnica que permite realizar el análisis químico elemental, tanto cualitativo como cuantitativo, de los elementos comprendidos entre el flúor (F) y el uranio (U) de muestras sólidas.

Descripción

La técnica utiliza la emisión fluorescente de la radiación X generada al excitar una muestra con una fuente de radiación X. En el procedimiento, el haz incidente expulsa electrones de capas interiores del átomo y los electrones que se encuentran en las capas más externas ocupan los lugares vacantes, produciéndose así un exceso energético en esta transición que se disipa en forma de fotones (radiación X fluorescente) con una longitud de onda característica que depende del gradiente energético entre los orbitales electrónicos implicados, y una intensidad directamente relacionada con la concentración del elemento en la muestra.

Equipo

El equipo requerido para este análisis es el espectrómetro secuencial de rayos X, en concreto se ha utilizado el Espectrómetro ARL ADVANT XP+ secuencial de la marca THERMO.



Figura 4.7. ARL ADVANT XP+ secuencial.

El equipo consta de un automuestreador con capacidad para 161 cassettes de diferentes diámetros, un tubo de rayos X de Rh y un goniómetro que consta a su vez de: 3 colimadores, 4 cristales que permiten medir desde el flúor hasta el uranio y dos detectores (SC y FPC). El equipo puede medir en dos ambientes: En He y en vacío.

5. Resultados y discusión

5.1 Difracción de rayos X

La técnica de difracción de rayos X se realizó en Los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) cuyo centro se encuentra en la Universidad de Málaga y está destinado a dar soporte científico-técnico de forma centralizada e integral, tanto a los diferentes grupos de investigación de la UMA como a instituciones públicas y empresas privadas.

Análisis

Tipo de muestra

- Polvo fino policristalino.

Análisis realizados

- Identificación de fases cristalinas mediante comparación de los difractogramas con la base de datos PDF Powder Diffraction File.
- Análisis cuantitativo de fases cristalinas por el método de Rietveld.

Resultados

El análisis consta de 2 procesos: Identificación y cuantificación. En el primero se identifican las fases y se representan mediante difractogramas, en los cuales aparecen los principales picos de difracción de la fase cristalina. Se distingue:

- La curva de análisis (-) correspondiente a la parte experimental.
- La curva de análisis (-) correspondiente a la(s) fase(s) de referencia.

En el segundo, el proceso de cuantificación, se utiliza el método Rietveld para comparar ambas curvas y determinar la cantidad de cada componente identificado en la muestra.

El factor del diagrama ponderado (Rwp) que aparece en la curva diferencial (debajo del difractograma) es el que determina la bondad del ajuste, cuanto más bajo mejor. Para considerarse bueno suele aceptarse por debajo de 10-15%.

Muestra 1

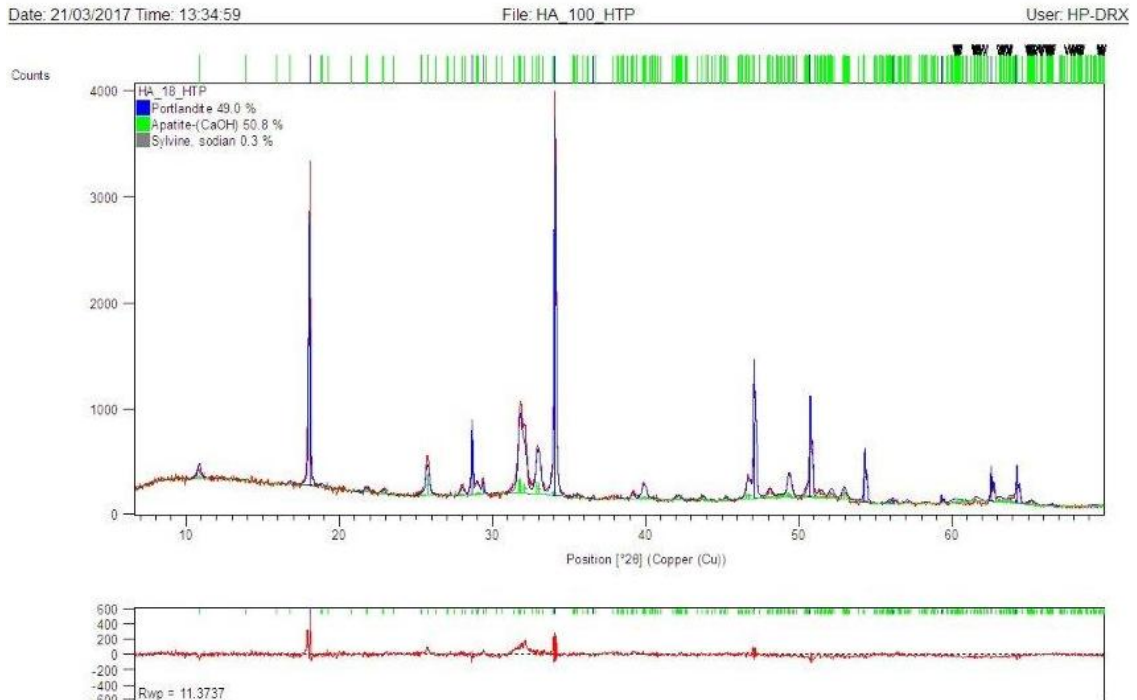


Figura 5.1. Difractograma de la muestra 1.

Muestra 2

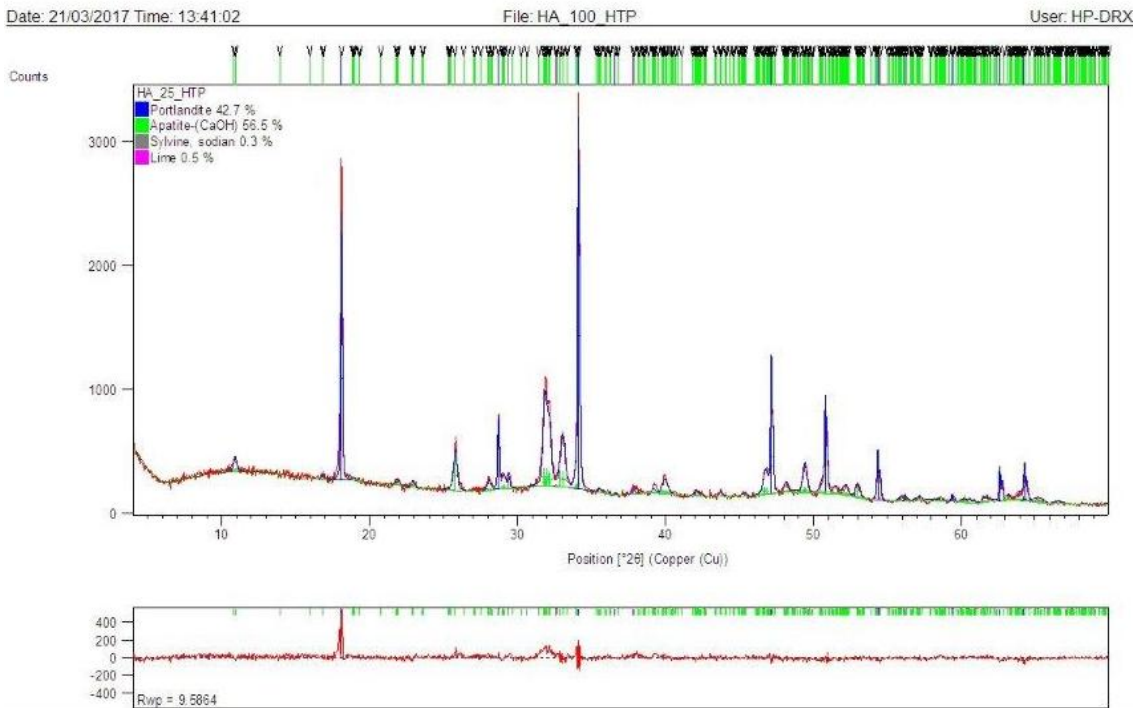


Figura 5.2. Difractograma de la muestra 2.

Muestra 3

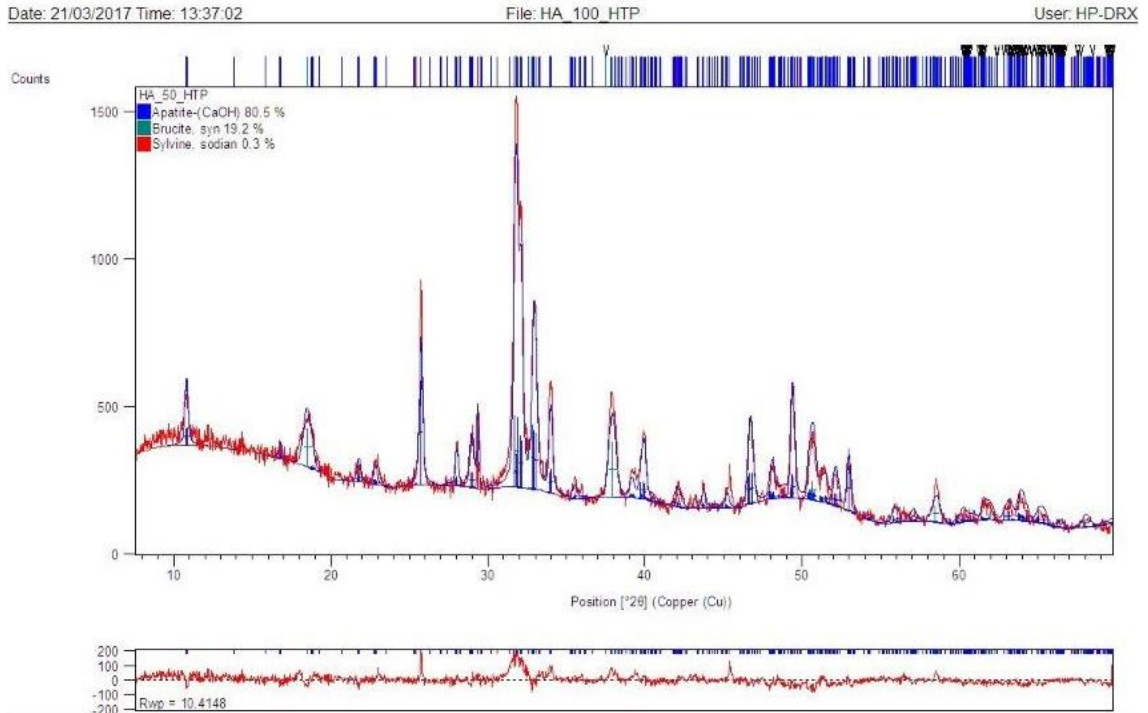


Figura 5.3. Difractograma de la muestra 3.

Muestra 4

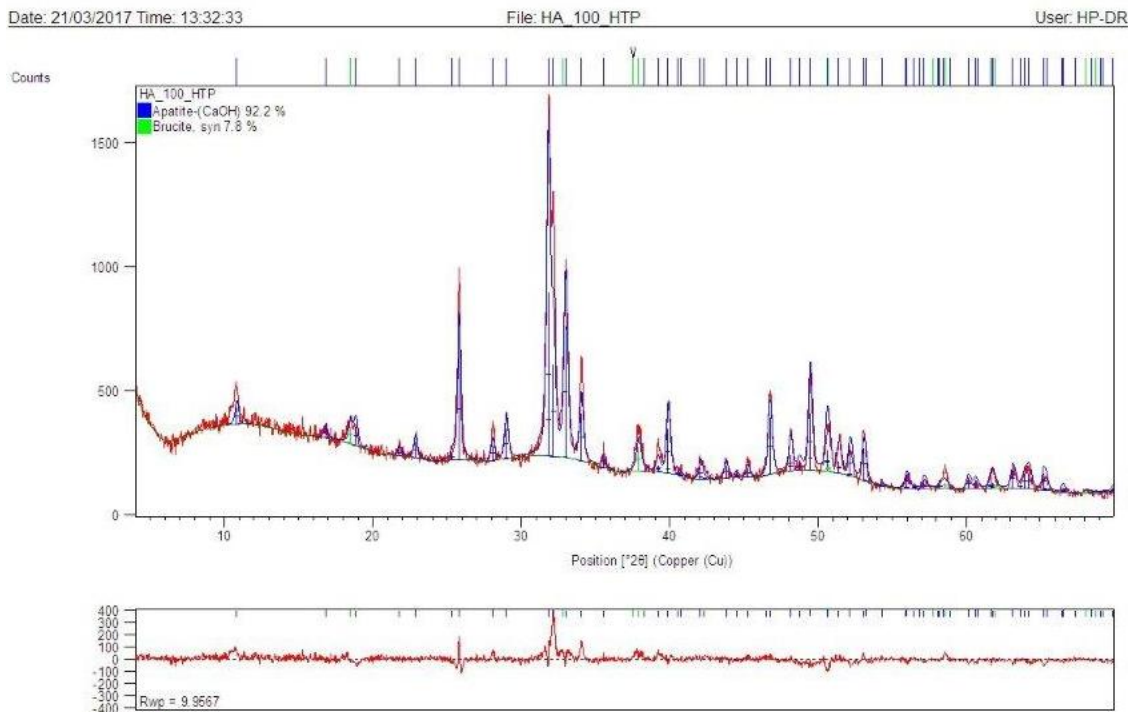


Figura 5.4. Difractograma de la muestra 4.

Muestra 5A

Tras el análisis rutinario de difracción de rayos X, se observó que la composición de la fase cristalina obtenida en la muestra 5A coincidía con la composición de un apatito de esmalte dental humano. Esta coincidencia nos llevó a realizar un análisis más detallado de afinamiento de Rietveld con el que se obtuvo los siguientes datos:

R-Values

R_{exp} : 4.92 R_{wp} : 7.97 R_p : 6.02 GOF : 1.62
R_{exp}` : 12.28 R_{wp}` : 19.89 R_p` : 19.21 DW : 0.83

Quantitative Analysis - Rietveld

Phase 1: Hydroxylapatite-dental 80.98 (21) %
Phase 2: Halite 15.35 (14) %
Phase 3: Calcite 3.66 (19) %

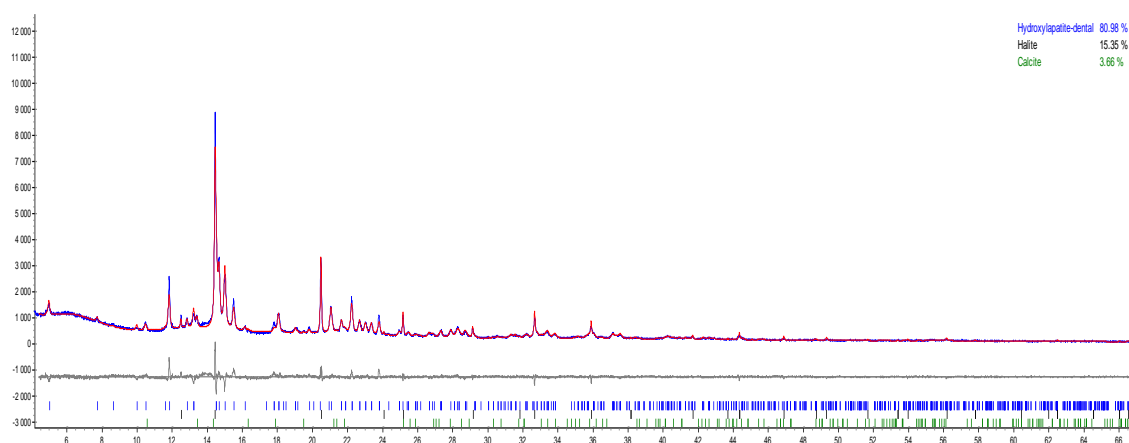


Figura 5.5. Difractograma de la muestra 5A.

Structure 1

Phase name	Hydroxylapatite-dental
R-Bragg	2.856
Spacegroup	176
Scale	0.00004140 (23)
Cell Mass	939.590
Cell Volume (Å ³)	525.894 (60)
Wt% - Rietveld	80.98 (21)
Crystallite Size	
Cry size Lorentzian (nm)	95 (12)
Cry size Gaussian (nm)	79.4 (93)
Strain	
Strain L	0.436 (35)
Strain G	0 (18)
Crystal Linear Absorption Coeff. (1/cm)	32.2459 (37)
Crystal Density (g/cm ³)	2.96681 (34)
Lattice parameters	
a (Å)	9.39775 (46)
c (Å)	6.87574 (40)

El análisis nos muestra un porcentaje de hidroxiapatita dental del 80.98%, además aparece halita en un 15.35%, un mineral que suele formarse por evaporación de agua salada y cuya composición química es cloruro de sodio. El 3.66% restante corresponde a la calcita, cuya composición química es carbonato cálcico (CaCO₃).

Interpretando el resultado se deduce que la halita puede ser eliminada sometiendo la muestra a un proceso de lavado para eliminar el exceso. Por otro lado, para eliminar la calcita y mejorar la síntesis se propuso un tratamiento de purificación con EDTA ya descrito en el apartado 3.2.6.2 de materiales y métodos. Tras ser tratada y posteriormente analizada se obtuvo el siguiente informe de resultados:

Muestra 5B

R-Values

R_{exp} : 5.09 R_{wp} : 7.90 R_p : 5.85 GOF : 1.55
R_{exp}` : 12.05 R_{wp}` : 18.69 R_p` : 17.49 DW : 0.88

Quantitative Analysis - Rietveld

Phase 1: Hydroxylapatite-dental 100.000 %

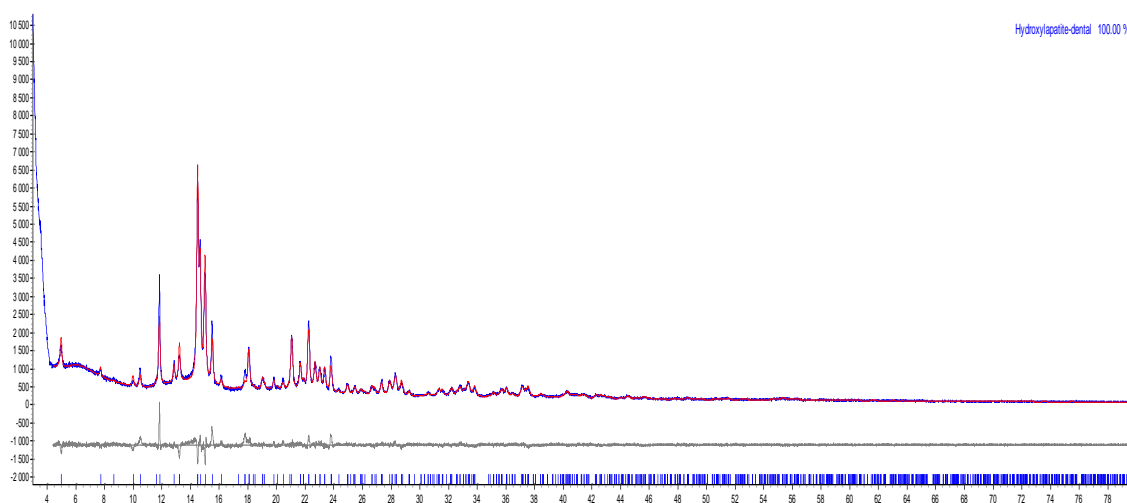


Figura 5.6. Difractograma de la muestra 5B.

El resultado obtenido nos indica que el tratamiento al que fue sometida la muestra ha sido efectivo y se ha conseguido eliminar la halita y la calcita en exceso, llegando a sintetizar un 100% de hidroxiapatita dental, siendo la primera vez que se obtiene con un 100% de pureza de manera artificial. Dicho material responde a la siguiente fórmula química: Ca_{9,48}Na_{0,22}Mg_{0,05}(PO₄)_{5,50}(CO₃)_{0,50}(OH)_{1,78} (Wilson 1999, pp. 1406-1014).

Muestra 1 calentada a 150°C

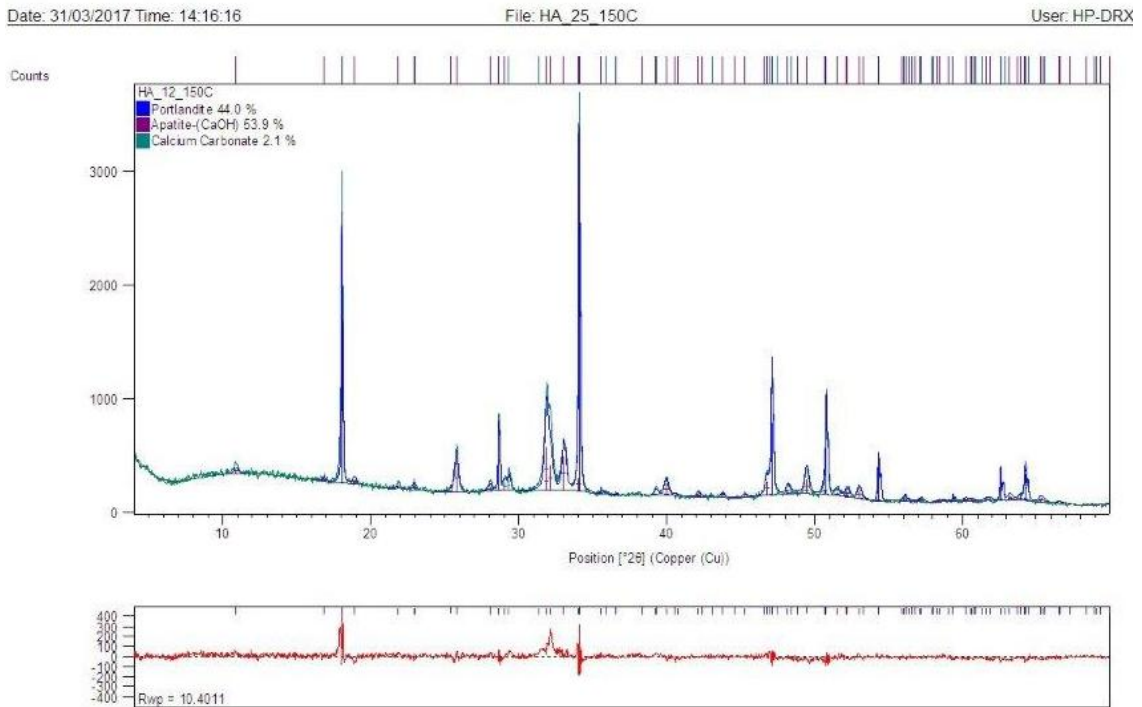


Figura 5.7. Difractograma de la muestra 1 a 150°C.

Muestra 2 calentada a 150°C

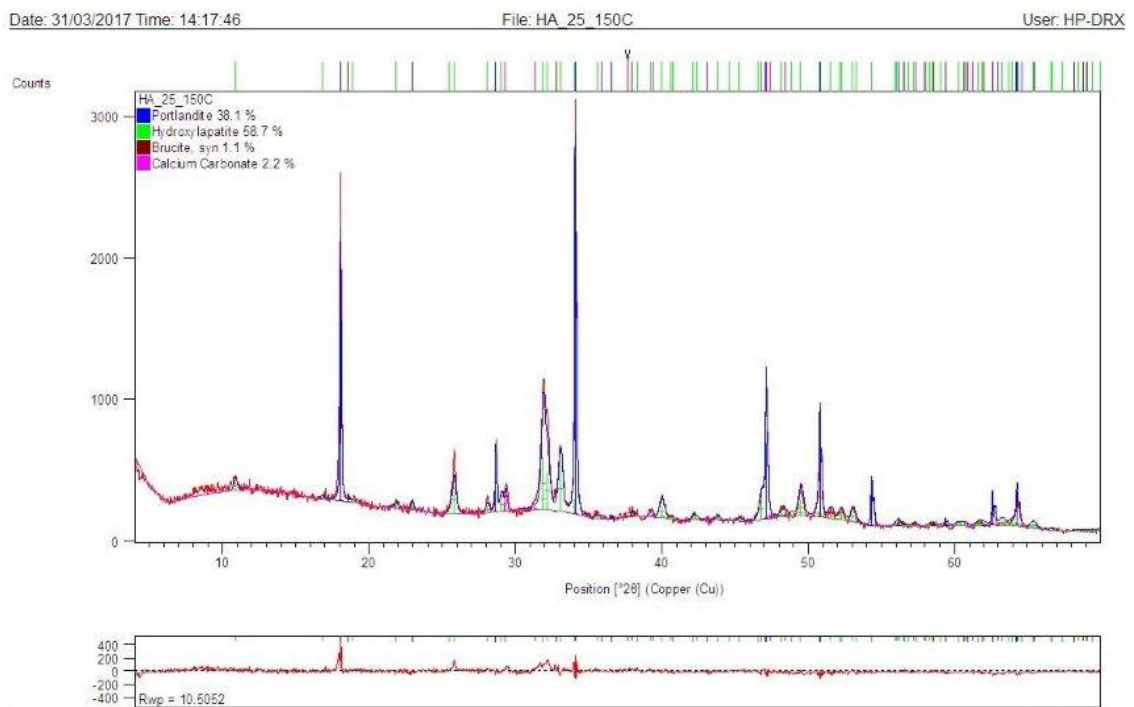


Figura 5.8. Difractograma de la muestra 2 a 150°C.

Muestra 3 calentada a 150°C

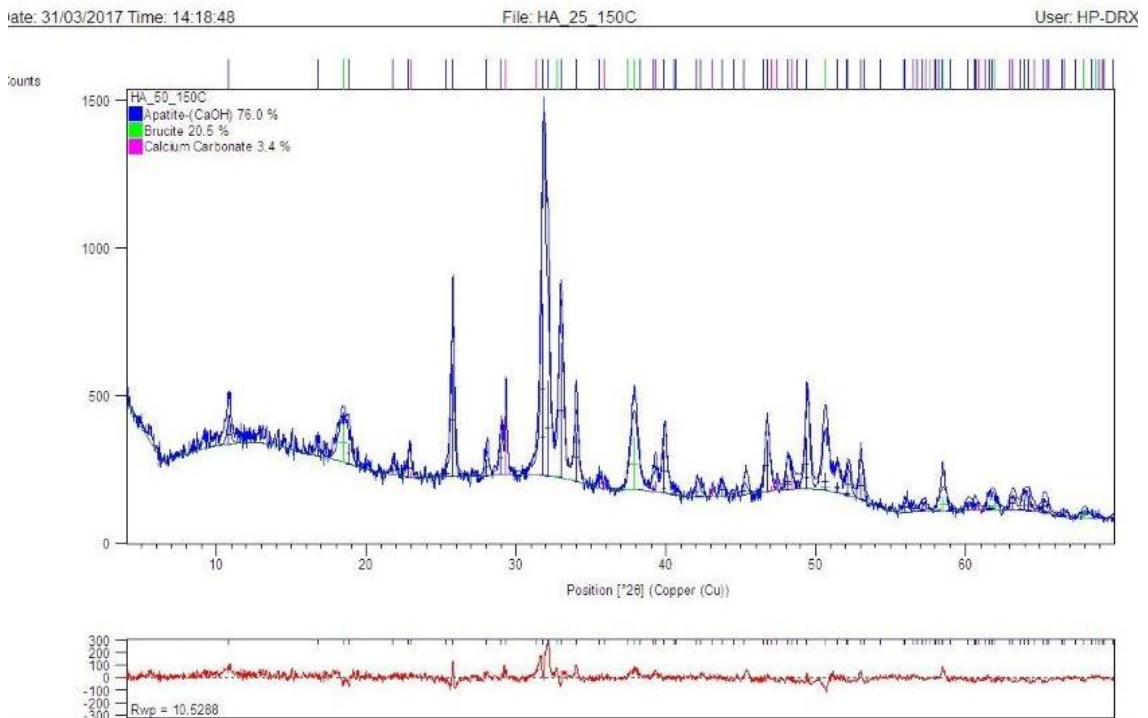


Figura 5.9. Difractograma de la muestra 3 a 150°C.

Muestra 4 calentada 150°C

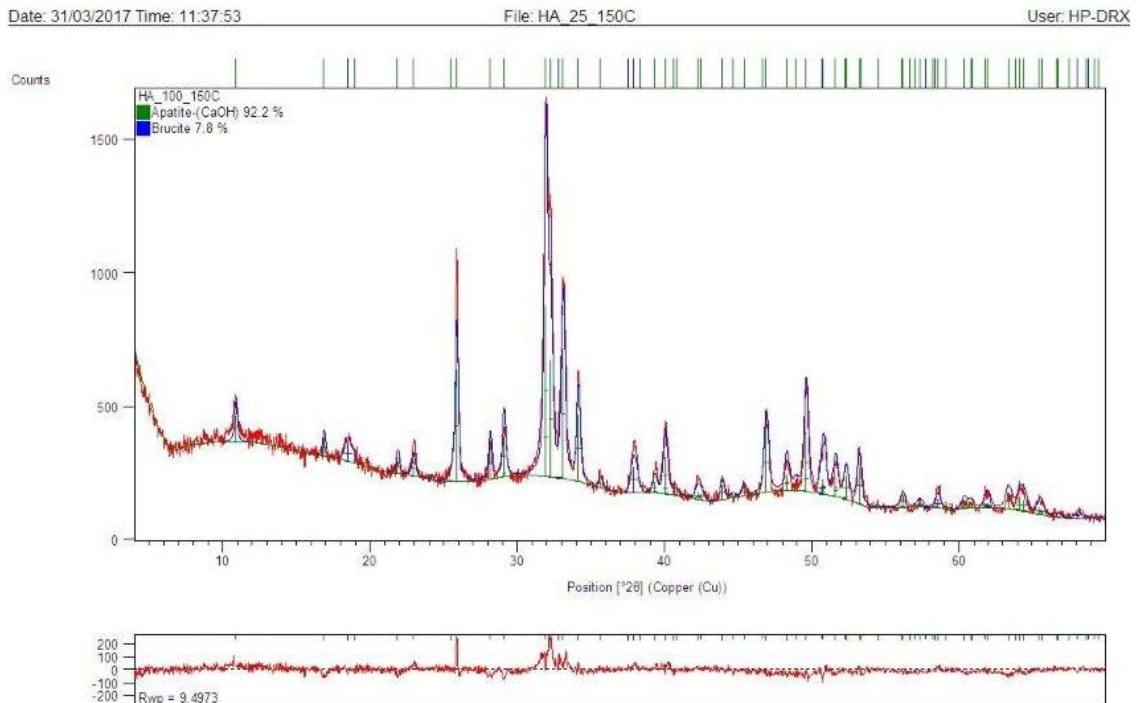


Figura 5.10. Difractograma de la muestra 4 a 150°C.

Una vez analizadas las muestras, se recoge en la tabla 5.1 todos los resultados obtenidos en la cuantificación de la fase cristalina, indicando el porcentaje de cada componente presente.

Tabla 5.1. Resultados Análisis DRX.

Agua de mar (%)	Fases cristalinas	Trt: RT (%)	Trt: 150°C (%)
12.00 (Muestra 1)	Apatito Portlandita (CaOH ₂) Calcita (CaCo ₃)	50.8 49.00 -	53.9 44.00 2.1
25.00 (Muestra 2)	Apatito Portlandita Calcita Brucita (MgOH ₂)	56.5 42.7 0.5 -	58.7 38.1 2.2 1.1
50.00 (Muestra 3)	Apatito Brucita Calcita	80.5 19.2 -	75.00 20.5 - 3.4
100.00 (Muestra 4)	Apatito Brucita Calcita	92.2 7.8	92.2 7.8
100.00 (Muestra 5A)	Apatito Halita Calcita	80.98 15.35 3.66	-
100.00 (Muestra 5B)	Apatito	100.00	-

Todas las muestras presentan el componente de apatita en mayor o menor porcentaje dependiendo de la síntesis. Además, aparecen otros componentes mayoritarios como la portlandita (hidróxido de calcio) y la calcita (carbonato cálcico) debido a un exceso de calcio, el cual no ha reaccionado durante la síntesis y brucita (hidróxido de magnesio) que se debe a un exceso de magnesio. Para mejorar la síntesis, se propuso aumentar la cantidad de ácido fosfórico con el fin de hacer que el calcio en exceso en forma de portlandita y calcita reaccionara y aumentara la formación de hidroxiapatita. Como resultado tenemos la muestra 5A que tiene un menor porcentaje de calcio sobrante y la muestra 5B que su composición es 100% hidroxiapatita.

La parte amorfa representa una pequeña región de la muestra, la cual no puede ser estudiada mediante este análisis por lo que se propuso el tratamiento térmico descrito en el apartado 3.2.6.1 de materiales y métodos, con el fin de que se produjera una mayor reacción y aumentara la síntesis. El tratamiento no aportó ninguna mejora considerable, ya que para concentraciones bajas si se produjo un aumento de hidroxiapatita poco significativo, el cual desaparecía en altas concentraciones. Se concluye pues que no es necesario el tratamiento, aun así, la cantidad de parte amorfa es muy baja y no supone condicionante.

El agua de mar favorece la síntesis de hidroxiapatita. En los experimentos con mayor concentración de agua de mar se produce una mayor síntesis de hidroxiapatita, de modo que la concentración de 100% agua de mar contiene un porcentaje del 92.2% de hidroxiapatita mientras que la concentración que únicamente tiene un 1/8 de agua de mar muestra un 50.8%.

Finalmente se concluye que la síntesis realizada con las cantidades teóricas de ácido fosfórico en una concentración de 100% de agua de mar, es el experimento que mejor resultado ha obtenido, sintetizándose no solo un alto porcentaje de apatito, sino que además tiene las mismas fases y composición que un apatito dental biológico presente en nuestro cuerpo (Wilson 1999, pp. 1406-1014). Esta coincidencia hizo que buscáramos una mejor síntesis y por ello se le realizó a la muestra 5A un tratamiento de purificación, obteniendo finalmente una síntesis del 100% de hidroxiapatita. Hemos conseguido por tanto obtener de forma sintética una apatita biológica existente de forma natural, aportamos así un método de síntesis novedoso de un material biomimético.

5.2 Análisis termogravimétrico (ATG).

Los análisis se realizaron en el Departamento de Química Inorgánica, Cristalografía y Mineralogía de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga y en Los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación.

Análisis

Tipo de muestra

- Polvo fino policristalino.

Análisis realizado

- Análisis termogravimétrico para la determinación del parámetro de la pérdida por calcinación o LOI (Loss On Ignition).

El análisis termogravimétrico ha tenido como objetivo, por un lado, determinar la cantidad de sustancias volátiles, en este caso el carbonato, que se descompone según la reacción: $\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{CaO} + \text{CO}_2$; y el agua, ya que los apatitos sintetizados a baja temperatura, al igual que los de origen biológico, retienen una cantidad variable de agua. Por otro lado, este análisis también nos sirve para determinar la pérdida por calcinación o LOI. El LOI es un parámetro que se obtiene por la diferencia entre el peso seco y el calcinado y sirve para la determinación cuantitativa elemental de los materiales por fluorescencia de rayos X, ya que este parámetro nos permite ajustar los resultados y reducir el error de análisis, aportando así mayor fiabilidad del método y un mejor resultado.

Resultados

La representación gráfica de la masa se denomina termograma, en él se muestra la curva de pérdida de peso (TG) y la curva que representa la derivada de la pérdida de peso (DSC), ambas expresadas en función de la temperatura y en porcentajes. Los resultados son representados en las figuras 5.11 y 5.12.

La pérdida por calcinación que se obtiene en la muestra 4 es del 16.57%, este valor es utilizado como valor promedio para los análisis de fluorescencia de las muestras: 3, 4 y 5A. Para la muestra purificada 5B, la pérdida por calcinación que se obtiene es del 11.69%. El menor contenido de volátiles de esta muestra se corresponde con su mayor grado de pureza en material apatítico.

Muestra 4

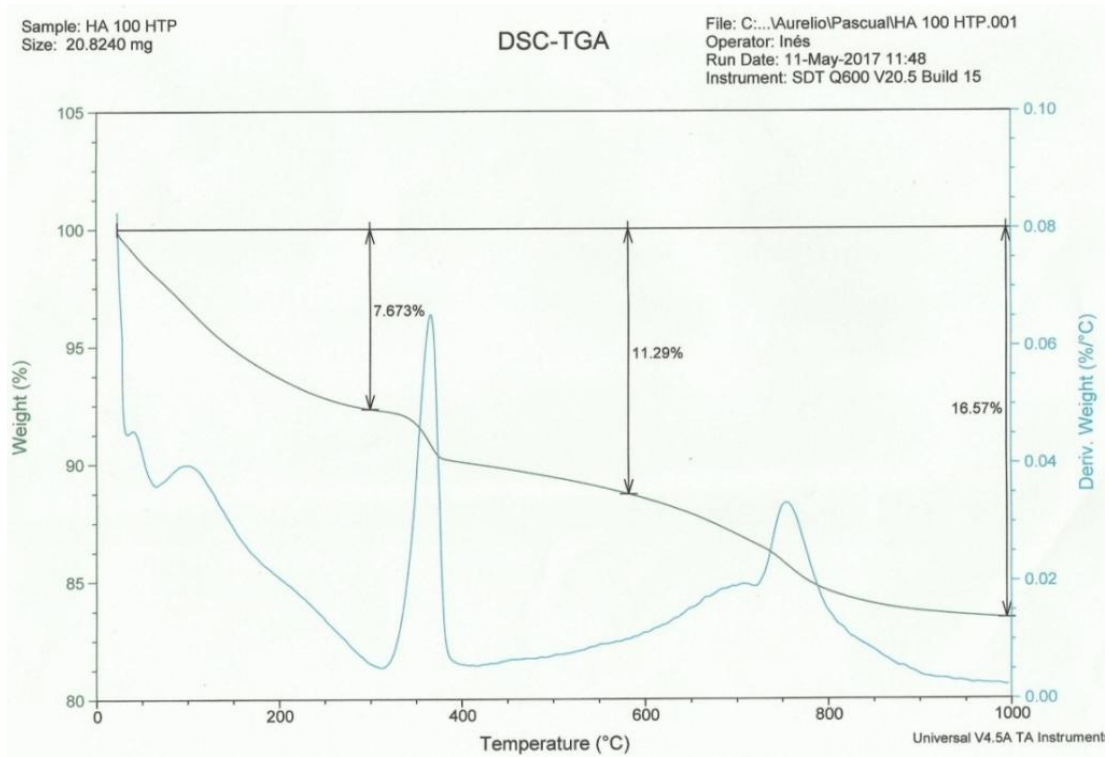


Figura 5.11. Termograma de la muestra 4.

Muestra 5B

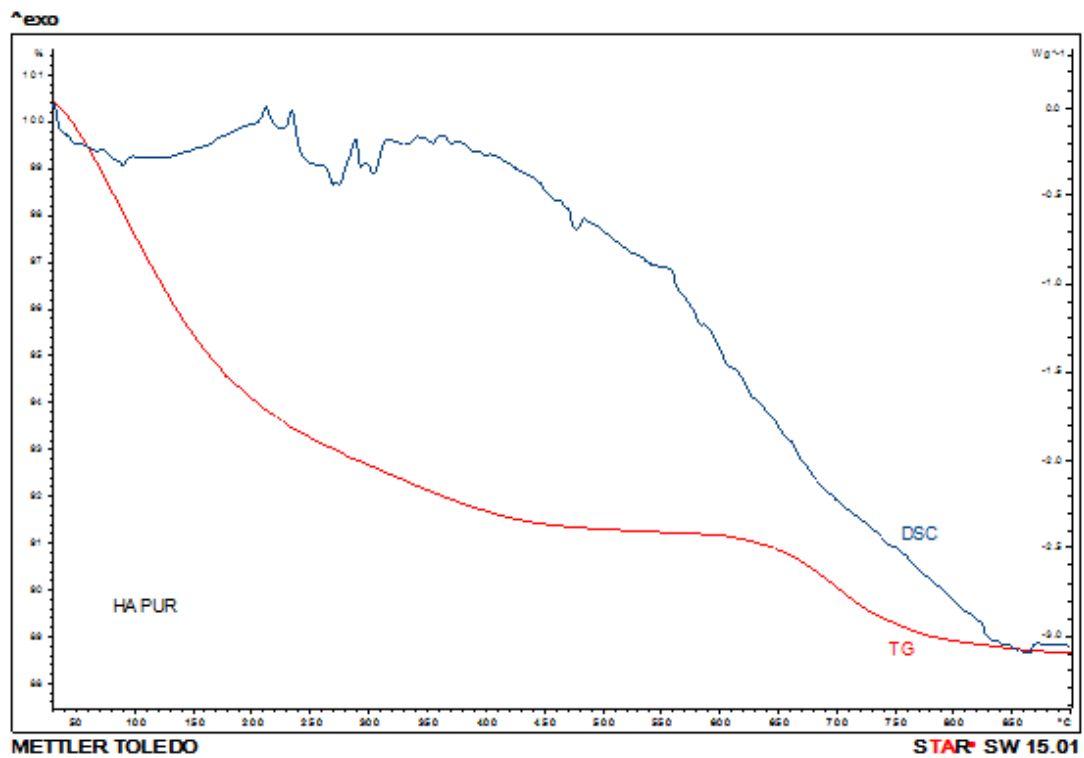


Figura 5.12. Termograma de la muestra 5B.

5.3 Fluorescencia de rayos X (XRF)

La técnica de fluorescencia de rayos X se realizó en Los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga.

Análisis

Tipo de muestra

- Polvo fino policristalino.

Análisis realizados

- Análisis químico elemental cualitativo.
- Análisis químico elemental cuantitativo.

Para la realización del ensayo la muestra se pesó, en una balanza de precisión, y se analizó en forma de polvo en atmósfera de helio. Los datos de concentración se obtuvieron mediante el software integrado UNIQUANT, en forma de óxidos y teniendo en cuenta el valor del LOI determinado por TG para ajustar el resultado. En las tablas 5.2-5.5 se muestran los resultados obtenidos.

Resultados

Muestra 3

Tabla 5.2. Composición química de la muestra 3.

Elemento	Peso (%)	Est. Error	Elemento	Peso (%)	Est. Error
Ca	33.44	0.18	Sn	0.0371	0.0031
Px	7.50	0.08	Ba	0.0356	0.0095
Mg	5.89	0.09	K	0.0222	0.0011
Sx	2.01	0.04	Cs	0.234	0.0070
Si	0.928	0.03	Sr	0.154	0.0008
Cl	1.42	0.06	Pb	0.139	0.0013
Na	0.687	0.06	Mn	0.0072	0.0008
Al	0.0471	0.0032	Ni	0.0034	0.0007
Fe	0.0529	0.0026	Zn	0.0027	0.0007

Datos de análisis:

- Concentración conocida: 16.57 LOI.
- Suma del peso antes de la normalización (%): 74.6%.
- Peso total de oxígeno (%): 31.29%.

Muestra 4

Tabla 5.3. Composición química de la muestra 4.

Elemento	Peso (%)	Est. Error	Elemento	Peso (%)	Est. Error
Ca	34.30	0.18	Al	0.0214	0.0024
Px	10.01	0.09	Sr	0.0196	0.0010
Mg	3.64	0.07	Sn	0.0128	0.0016
Sx	1.97	0.04	Mn	0.0061	0.0008
Si	0.284	0.014	K	0.0051	0.0007
Na	0.396	0.06	Ti	0.0021	0.0006
Cl	0.275	0.014	Zn	0.0023	0.0006
Fe	0.0443	0.0022	-	-	-

Datos de análisis:

- Concentración conocida: 16.57 LOI.
- Suma del peso antes de la normalización (%): 76.2%.
- Peso total de oxígeno (%): 32.45%.

Muestra 5A

Tabla 5.4. Composición química de la muestra 5A.

Elemento	Peso (%)	Est. Error	Elemento	Peso (%)	Est. Error
Ca	31.17	0.18	Fe	0.0376	0.0019
Px	12.42	0.10	Sr	0.0223	0.0011
Sx	1.58	0.04	Al	0.0123	0.0022
Mg	2.23	0.06	Sn	0.0162	0.0017
Cl	2.20	0.07	Mn	0.0052	0.0007
Na	0.912	0.06	Rh	0.0045	0.0011
K	0.0770	0.0038	Br	0.0032	0.0003
Si	0.0307	0.0018	-	-	-

Datos de análisis:

- Concentración conocida: 16.57 LOI.
- Suma del peso antes de la normalización (%): 78.1%.
- Peso total de oxígeno (%): 32.71%.

Muestra 5B

Tabla 5.5. Composición química de la muestra 5B.

Elemento	Peso (%)	Est. Error	Elemento	Peso (%)	Est. Error
Ca	35.93	0.18	Sr	0.0282	0.0014
Px	13.24	0.10	Al	0.0141	0.0024
Sx	1.90	0.04	Cs	0.0240	0.0071
Mg	0.883	0.04	K	0.0163	0.0008
Na	0.527	0.07	Pb	0.0084	0.0014
Cl	0.436	0.022	Rh	0.0058	0.0018
Si	0.0364	0.0018	Mn	0.0049	0.0008
Fe	0.0426	0.0021	Cu	0.0032	0.0007
Sn	0.0413	0.0033	V	0.0019	0.0007
Ba	0.0368	0.0090	Ni	0.0025	0.0007

Datos de análisis:

- Concentración conocida: 16.57 LOI.
- Suma del peso antes de la normalización (%): 78.1%.
- Peso total de oxígeno (%): 35.13%.

Todas las muestras presentan sus mayores porcentajes en el calcio y en el fósforo, correspondiente a los elementos utilizados para la síntesis de la apatita a través de los productos: Hidróxido de calcio y ácido fosfórico. Aparecen también otros elementos más minoritarios como el sulfato, el magnesio, el sodio, cloruros y potasio que se encuentran presentes en el agua de mar artificial utilizada y que verifican que los materiales sintetizados incorporan iones presentes en el medio de reacción.

5.4 Microscopía electrónica de barrido

La técnica de microscopía se realizó en Los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga.

Análisis

Tipo de muestra

- Polvo fino policristalino.

Análisis realizados

- Morfología y superficie de la muestra.

Resultados

Este tipo de análisis nos permite visualizar la morfología de los sólidos obtenidos con distintas resoluciones: 50, 10, 5 y 2 μm a 20 kV. En las figuras 5.13 y 5.14 se muestran las imágenes SEM para materiales de distinta composición al objeto de observar posibles cambios morfológicos.

Muestra 4

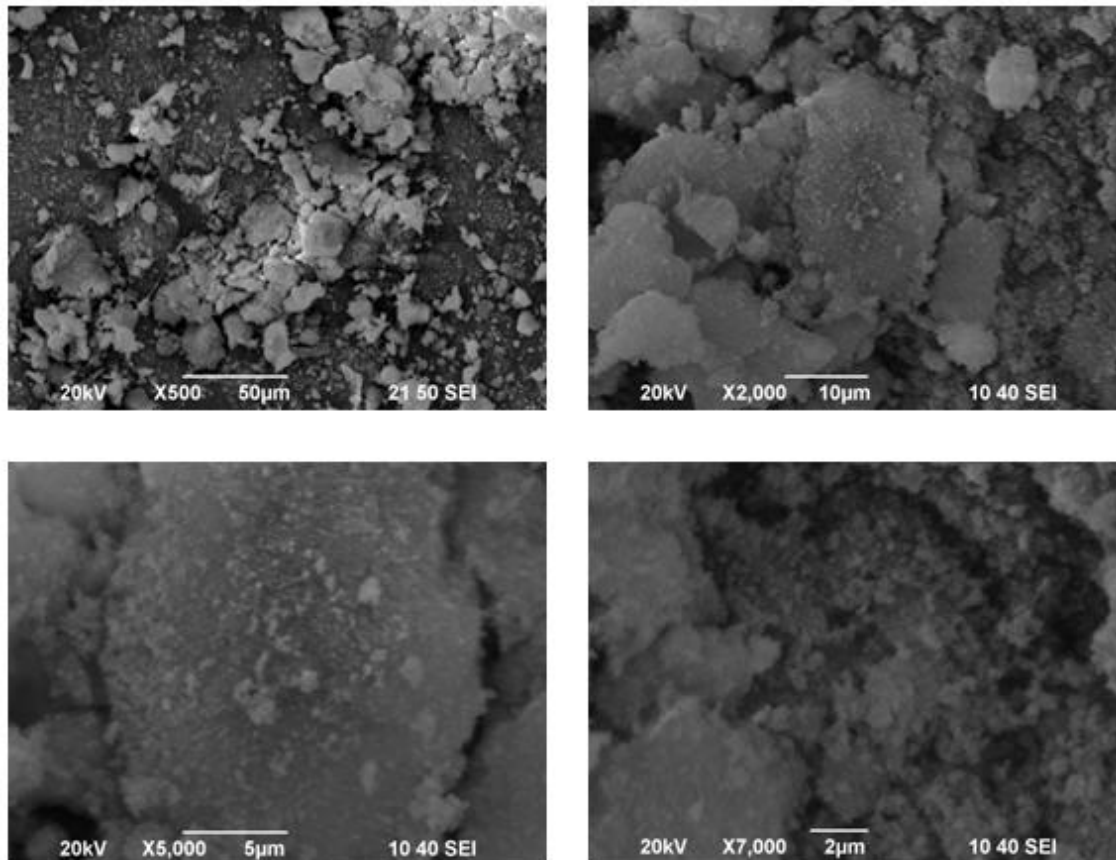


Figura 5.13. Imágenes SEM de la muestra 4.

Muestra 5A

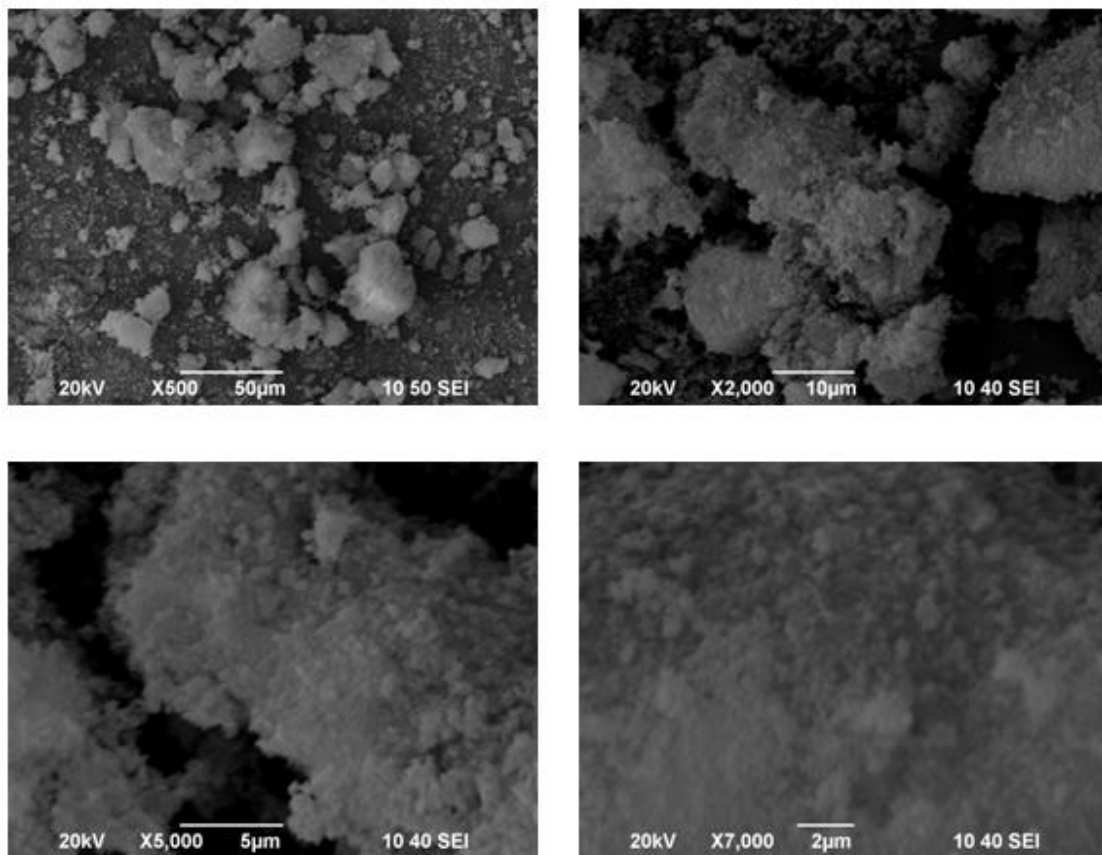


Figura 5.14. Imágenes SEM de la muestra 5A.

Las imágenes muestran que los materiales están formados por aglomerados de partículas cuyas dimensiones están en la escala micrométrica o inferior, sin que se observen variaciones apreciables debido a la diferente composición de las mismas. Esto indica que la morfología es más dependiente de las condiciones de síntesis de los materiales, que fueron idénticas para todos ellos, que de la composición química de los mismos.

5.5 Análisis de superficie por adsorción de nitrógeno

El análisis de superficie se realizó en Los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación cuyo centro se encuentra en la Universidad de Málaga.

Análisis

Tipo de muestra

- Polvo fino policristalino.

Análisis realizados

- Caracterización de la superficie porosa de los sólidos.
- Análisis de quimisorción.

Con este análisis se pretendió caracterizar la textura superficial de los sólidos. A partir de la isoterma de adsorción-desorción de N₂ a 77 K se determina la superficie específica de los sólidos, mediante el método B.E.T, desarrollado por Brunauer, Emmett y Teller. Este método permite determinar la superficie basándose en un modelo de adsorción en multicapas de un gas inerte, nitrógeno, a baja temperatura.

Resultados

Muestra 4

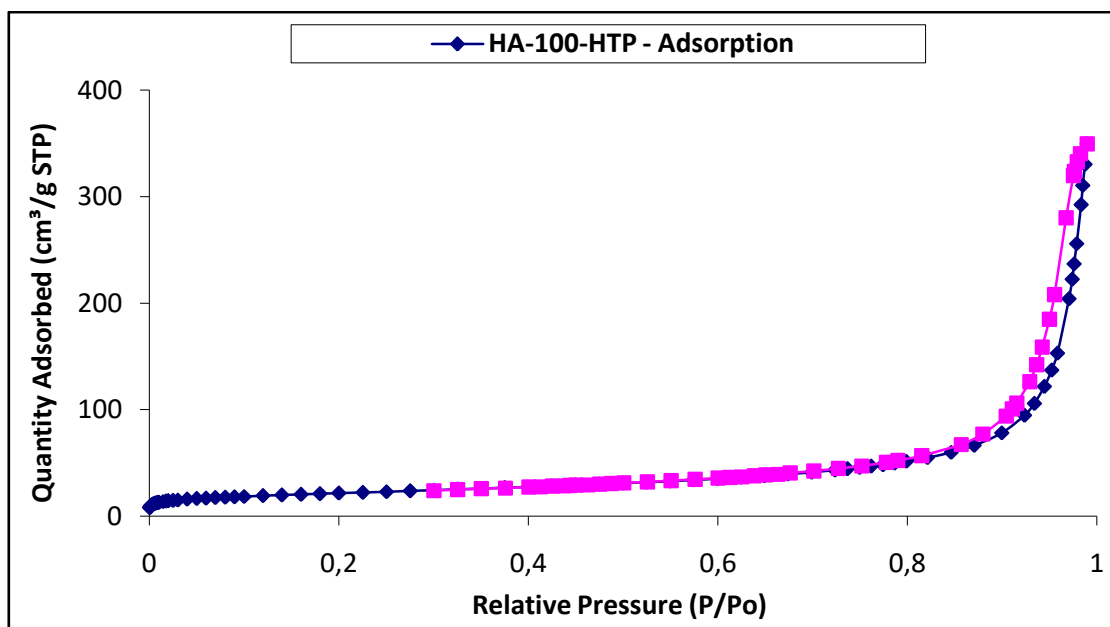


Figura 5.15. Gráfica de Adsorción de la muestra 4.

Área de superficie:

- Área de superficie BET: 77.2852 m²/g.
- t-Plot área de microporo: 6.8457 m²/g.
- t-Plot área de superficie externa: 70.4394 m²/g.

Tamaño de poro:

- BJH*; Diámetro medio de porosidad de adsorción (4V/A): 285.938 Å.

Muestra 5A

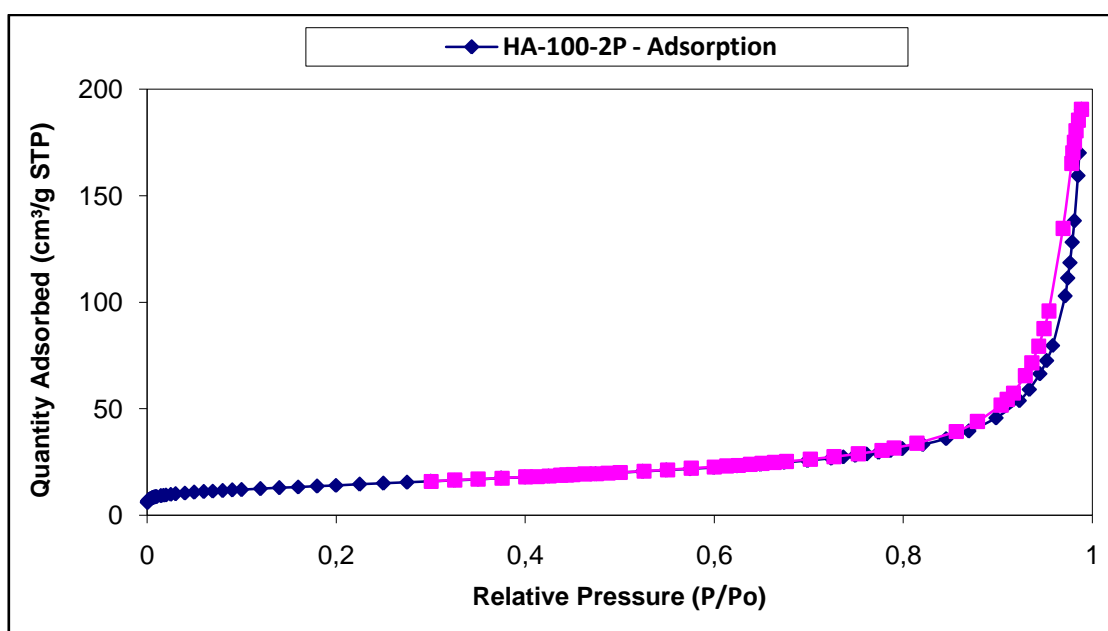


Figura 5.16. Gráfica de Adsorción de la muestra 5A.

Área de superficie:

- Área de superficie BET: 50.3506 m²/g.
- t-Plot área de microporo: 8.3950 m²/g.
- t-Plot área de superficie externa: 41.9556 m²/g.

Tamaño de poro:

- BJH; Diámetro medio de porosidad de adsorción (4V/A): 252.777 Å.

La ecuación de Brunauer-Emmett-Teller se emplea rutinariamente para la determinación del área específica superficial total de un adsorbente. La adsorción es el fenómeno de concentración (depósito) de una sustancia (adsorbato o soluto) sobre la superficie de un sólido. Las curvas que se muestran corresponden al tipo II de la clasificación de la IUPAC.

El adsorbato cubre al adsorbente hasta que se forma una monocapa y el proceso continúa con adsorción en multicapas. La cantidad de soluto adsorbido es función de la naturaleza y área específica superficial del adsorbente y del soluto, así como de la presión (P) ó concentración (C) de este último y de la temperatura del sistema.

El área del microporo nos indica que las muestras presentan poca cantidad de poros ya que para el primer caso únicamente 6.8457 m²/g del área total corresponde a poros, al igual que en el segundo caso en el que solo presenta 8.3950 m²/g. Cabe esperar este resultado ya que se trata de un sólido cristalino, los cuales no se caracterizan por su porosidad.

Al final del proceso se observa histéresis, que se produce cuando la isoterma de adsorción no coincide con la isoterma de desorción. Esto se debe a la presencia de microporos en la superficie, que provoca condensación capilar del adsorbato y entonces, la desorción se lleva a cabo bajo la presión del líquido puro.

*(BJH) = Método de Barrett, Joyner, Halenda.

5.6 Espectrometría infrarroja (ATR)

La técnica de espectrometría infrarroja se realizó en Los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación, cuyo centro se encuentra en la Universidad de Málaga.

Análisis

Tipo de muestra

- Polvo fino policristalino.

Análisis realizados

- Registro de espectros ATR.

El rango espectral usado es de $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$, la resolución espectral de 4 cm^{-1} y el tiempo de acumulación 64 s.

Resultados

Una HA típica muestra bandas para un espectro FTIR en (3600 , 3569 , 3578 , 3448 y 633) cm^{-1} correspondientes a grupos OH^- ; bandas en (474 , 571 , 601 , 692 , $1032 \approx 1087$, 1092 , 1040) cm^{-1} correspondientes a grupos PO_4^{3-} y bandas entre (870 , 1420 y 1480) cm^{-1} si la muestra contiene grupos CO_3 (Fowler 1966, pp.477.492).

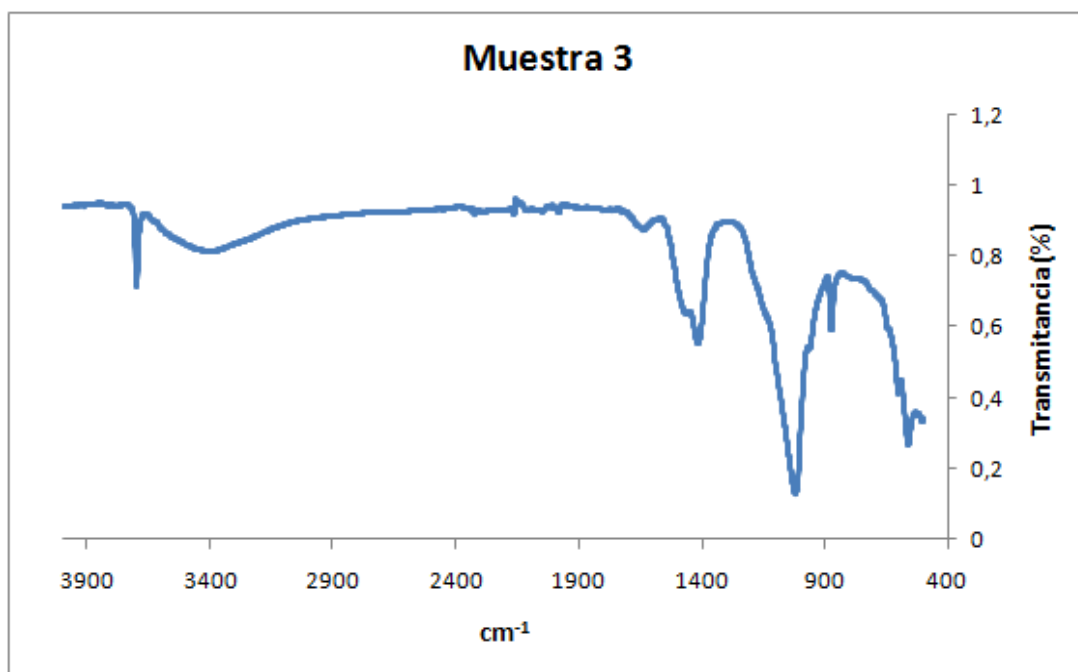


Figura 5.17. Espectro infrarrojo de la muestra 3.

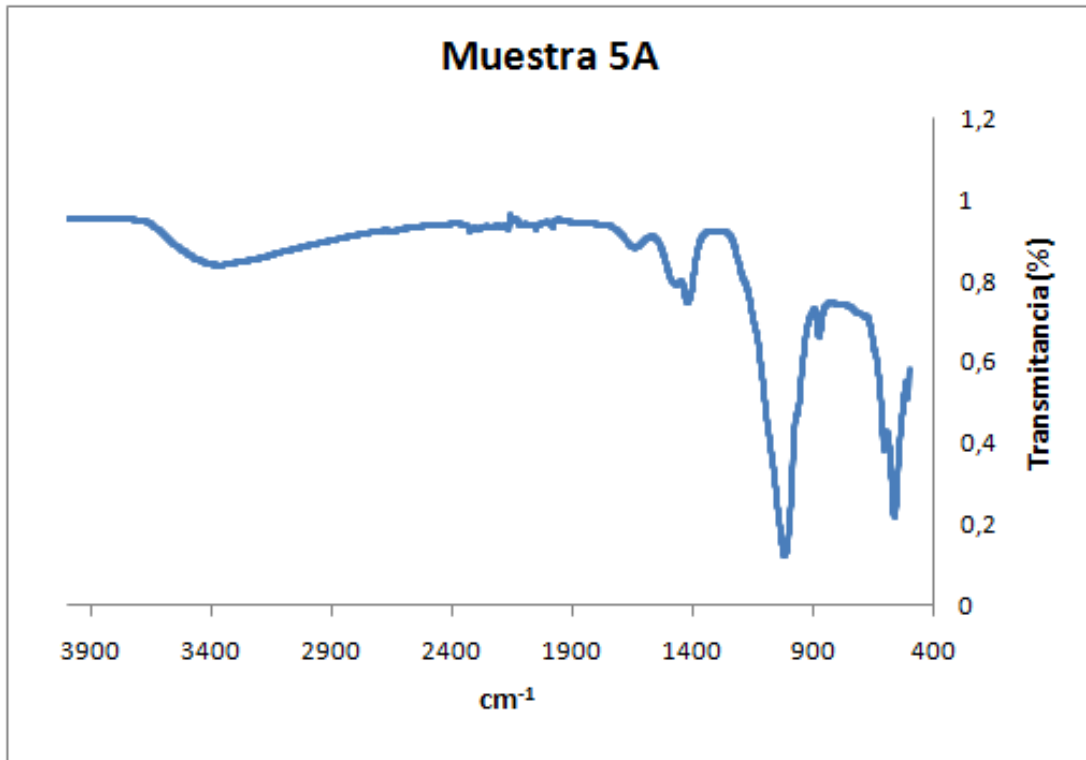


Figura 5.18. Espectro infrarrojo de la muestra 5A.

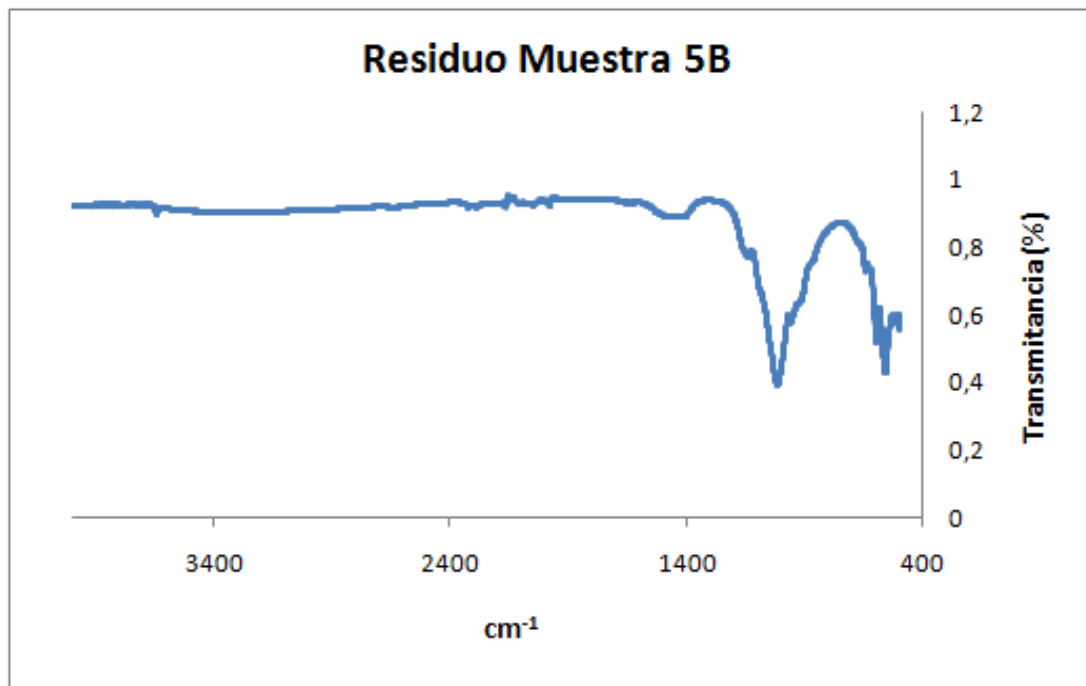


Figura 5.19. Espectro infrarrojo de la muestra 5B.

Los espectros ATR-FTIR para tres muestras seleccionadas se recogen en las figuras 5.17 a 5.19. Las bandas de vibración más importantes son las siguientes:

Región 3570-3700 cm⁻¹; Correspondiente a la vibración de tensión ν_{OH} de los grupos hidroxilos.

La banda a 3697 cm^{-1} , claramente visible para la muestra 3, pertenece a los hidroxilos de la brucita (Ma et al. 2013), la fase cristalina secundaria que está presente en esta muestra, según se identificó mediante cristalografía de rayos X. Destacar que esta banda, sobre 3570 cm^{-1} , apenas se aprecia en las muestras de apatito más puras, pero suele ser bastante común en este tipo de materiales (Gentile 2015).

Región $3400\text{ y }1640\text{ cm}^{-1}$ (agua adsorbida); Teniendo en cuenta que los grupos OH^- del agua aparecen en estos mismos números de onda para las muestras 3 y 4, puede haber un aporte a las intensidades de las bandas según el grado de hidratación, por lo que es lógico que el residuo de la muestra 5B no lo presente debido a que fue calcinada a 1000°C .

Región de $900\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$; Las bandas de absorción pertenecientes a los modos de vibración de los iones fosfatos. Los modos ν_1 y ν_3 corresponden a las tensiones simétricas y antisimétricas del enlace P–O. Sus frecuencias son 962 cm^{-1} para ν_1 y 1040 y 1092 cm^{-1} para los dos componentes de ν_3 . Sin embargo, la incorporación de otros aniones en la estructura induce distorsiones locales alrededor de los grupos fosfatos y otras bandas pueden aparecer en esta región del espectro, haciendo compleja su interpretación. De hecho, en los espectros IR de tejidos dentales las bandas más intensas están centradas a aproximadamente 1000 cm^{-1} . En las muestras analizadas en este trabajo las bandas de fosfato aparecen centradas a 1020 cm^{-1} , un valor muy próximo al de las muestras biológicas (Abraham 2011), lo cual confirma la similitud química de nuestras muestras con las de los apatitos dentales. También se detecta un pico a 1130 cm^{-1} que ha sido atribuido al ion HPO_4^{2-} (Gentile 2015).

Otras regiones; Las correspondientes a $\nu_4(\text{PO})_4$ ($565\text{--}603\text{ cm}^{-1}$); $\nu_2(\text{CO})_3$ a 875 cm^{-1} y $\nu_3(\text{CO})_3$ a $1420\text{--}1457\text{ cm}^{-1}$.

5.7 Estudio de biocompatibilidad

Estudios

Tipo de muestra

- 3 pastillas de la muestra 3.
- 3 pastillas de la muestra 4.
- 3 pastillas de la muestra 5B.

Para la preparación de las muestras 3 y 4, se tomaron para cada pastilla 0.20 g que se compactaron con una fuerza de 2Pa (en 2 ocasiones) y en un diámetro de 13 mm. Para la preparación de la muestra 5B se tomó 0.1 g que se compactó con una fuerza de 1Pa (en 2 ocasiones) y en un diámetro de 10 mm.

Estudios realizados

- Estudio de la viabilidad celular mediante MTS.
- Estudio de la adhesión y de la morfología mediante SEM.
- Estudio de la morfología y de la diferenciación celular mediante ensayos de inmunofluorescencia.

Previamente a los estudios es necesario realizar un proceso de tripsinización. La tripsina es una enzima que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis. En cultivos celulares se utiliza para despegar las células de la superficie de la placa de cultivo y poder tenerlas en suspensión.

Protocolo de tripsinización

El procedimiento se realiza bajo la campana de flujo laminar Telstar AV 30/70 y consta de los siguientes pasos:

1. Atemperar todos los reactivos, el medio de cultivo, la tripsina y el PBS.
2. Una vez atemperados, lavar el frasco de cultivo dos veces con PBS.
3. Añadir 4 ml de tripsina e incubar a una temperatura de 37°C con un 5% de CO₂ y un 90% de humedad durante 2-3 minutos.
4. Añadir el medio de cultivo para inhibir la tripsina.
5. Resuspender el medio de cultivo y coger 10 µl de la suspensión de células para mezclar con 10 µl de tripano azul.

6. Contar las células con un microscopio teniendo en cuenta que las células que están teñidas de azul no se cuentan porque están muertas, ya que el tripano azul, es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana.
7. Calcular las células que tenemos con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ células contadas}}{\text{n}^\circ \text{ cuadros contados}} \times 2 \times 10000$$

El número total de células obtenidas fue de $2.4 \cdot 10^6$ células. Una vez cuantificadas se preparan 12 pocillos en los que se coloca una muestra por pocillo con un total de: 3 pastillas de la muestras 3, 3 pastillas de la muestra 4, 3 pastillas de la muestra 5B y 3 pocillos control únicamente con células. En cada uno se añade la suspensión con 30000 células y se deja durante 12 días, con cambios de cultivo, para que las células se adhieran adecuadamente.

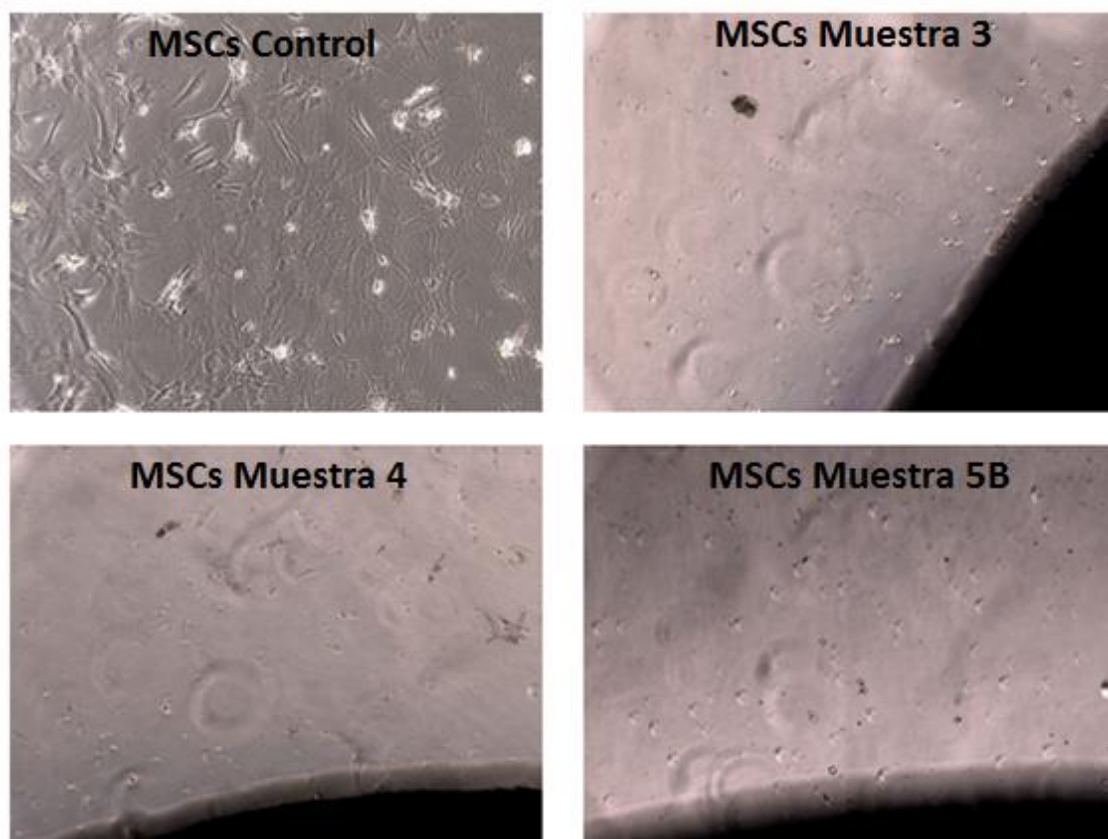


Figura 5.20. Cultivo celular día 10.

Estudio de la viabilidad celular mediante MTS

La viabilidad celular se evaluó utilizando el compuesto (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio), mediante el Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, MTS (Promega).

Este estudio se realiza a través del método colorimétrico que determina el número de células vivas debido a la bio-reducción del reactivo de Owen, por la acción de las co-enzimas NADPH (Nicotinamida-Adenina Dinucleotido fosfato) o NADH producidas en las enzimas deshidrogenasas presentes en las células metabólicamente activas. Como consecuencia se obtiene un producto coloreado, el formazán, el cual es soluble en el medio de cultivo y puede ser cuantificado midiendo la absorbancia.

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, el material es transferido a placas de 24 pocillos y lavado repetidas veces con PBS. El medio de cultivo DMEM, pero esta vez sin rojo fenol y sin FBS, es mezclado con el reactivo MTS en una relación 5:1 y añadido hasta cubrir totalmente los materiales. Tras 3 horas de incubación con 5% de CO₂ a 37°C y en ausencia de luz, son extraídos 100 µl de medio y depositados en placas de 24 pocillos para medir la absorbancia a 490 nm utilizando un lector multiplacas (EON BIOTEK).

Estudio de la morfología y de la diferenciación celular mediante ensayos inmunofluorescencia.

Se estudió la morfología celular mediante la tinción del citoesqueleto de actina. Para ello, cumplido el tiempo de cultivo, las muestras fueron lavadas con PBS, fijadas con una disolución de formalina al 10% durante 1 hora a una temperatura de 4°C y finalmente lavadas 3 veces con PBS.

Para la preparación de la tinción, las muestras fueron lavadas con tampón fosfato (PB) 0.1 M durante 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadió el tampón bloqueo (TB) que contenía 8.9 ml de PB (0.1 M), 1 ml de FBS (10%) y 0.1 ml de triton X-100 al 0.1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió el tampón bloqueo junto con 10 µl de bodipy-FL phalloidin (Invitrogen) por cada muestra y se mantuvo durante toda la noche a 4°C y en ausencia de luz. Transcurrido ese tiempo, se eliminó esta disolución y se realizó tres lavados con PB 0.1 M cada 5 min. Seguidamente se procedió al montaje en el portaobjetos y se adicionó una gota de medio de montaje con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) incorporando (Vectashield, Vector Laboratories, Inglaterra) que permitió teñir los núcleos celulares.

Estudio de la adhesión y de la morfología mediante SEM.

Para estudiar la adhesión y la morfología adoptada por las células cultivadas sobre los distintos soportes se empleó el microscopio electrónico de barrido con un voltaje de 10 kV. Las muestras fueron lavadas 2 veces con PBS y fijadas con una disolución de glutaraldeído al 2% durante 1 día. Transcurrido dicho tiempo fueron lavadas con PBS 3-4 veces en intervalos de 5 min. Previamente a la observación en SEM las muestras fueron deshidratadas realizando cambios a distintas concentraciones de EtOH (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%) cada 5 min. Las muestras fueron secadas por el método del punto crítico y fueron recubiertas con oro para su posterior análisis.

Resultados

5.7.1 Estudio de la viabilidad celular mediante MTS

Tabla 5.6. Absorbancia celular MTS.

Células	Células2	Células3	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5B
1.443	1.438	1.376	0.286	0.263	0.336
1.386	1.421	1.401	0.288	0.263	0.334
1.409	1.396	1.369	0.286	0.26	0.34
1.389	1.401	1.353	0.283	0.26	0.336
1.40675	1.414	1.37475	0.28575	0.2615	0.3365

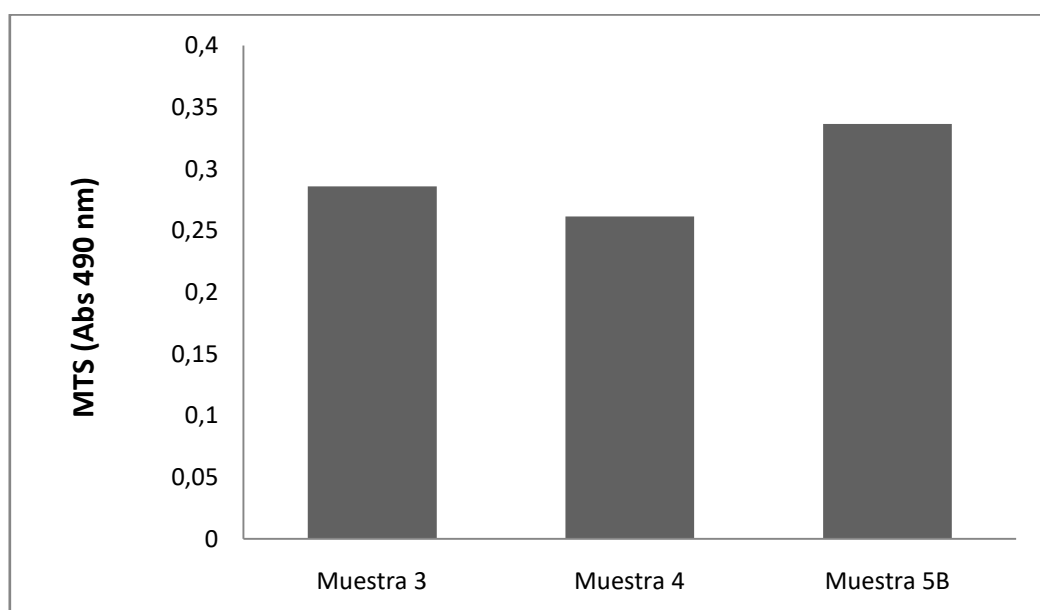


Figura 5.20. Gráfica de absorbancia celular MTS.

La cantidad de Formazan producido es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo, esto quiere decir que a mayor absorbancia, mayor número de células vivas. Los parámetros obtenidos para las muestras 3 y 4 no son relevantes ya que los datos entorno al 0.2 son cantidades muy bajas y pueden confundirse con las propias células ancladas en el plástico de la placa, se podría considerar como un factor de error, el cual no nos aporta ninguna información. Para la muestra 5B, se observa mayor actividad celular, aun así sigue siendo muy baja.

5.7.2 Estudio de la morfología y de la diferenciación celular mediante ensayos inmunofluorescencia.

Los resultados de inmunofluorescencia vienen recogidos en las figuras 5.21-5.23.

Esta técnica nos permite ver las células mediante una técnica colorimétrica, la cual tiñe el núcleo en color azul y el citoesqueleto en color verde. En las células muertas únicamente se observa el color azul redondeado, mientras que las células vivas se muestran expandidas y con el citoesqueleto teñido en verde. En el estudio se observó que en las muestras 3 y 4 no había actividad celular, mientras que en la muestra 5B se pudieron encontrar varias células ancladas y en interfase.

Muestra 5B

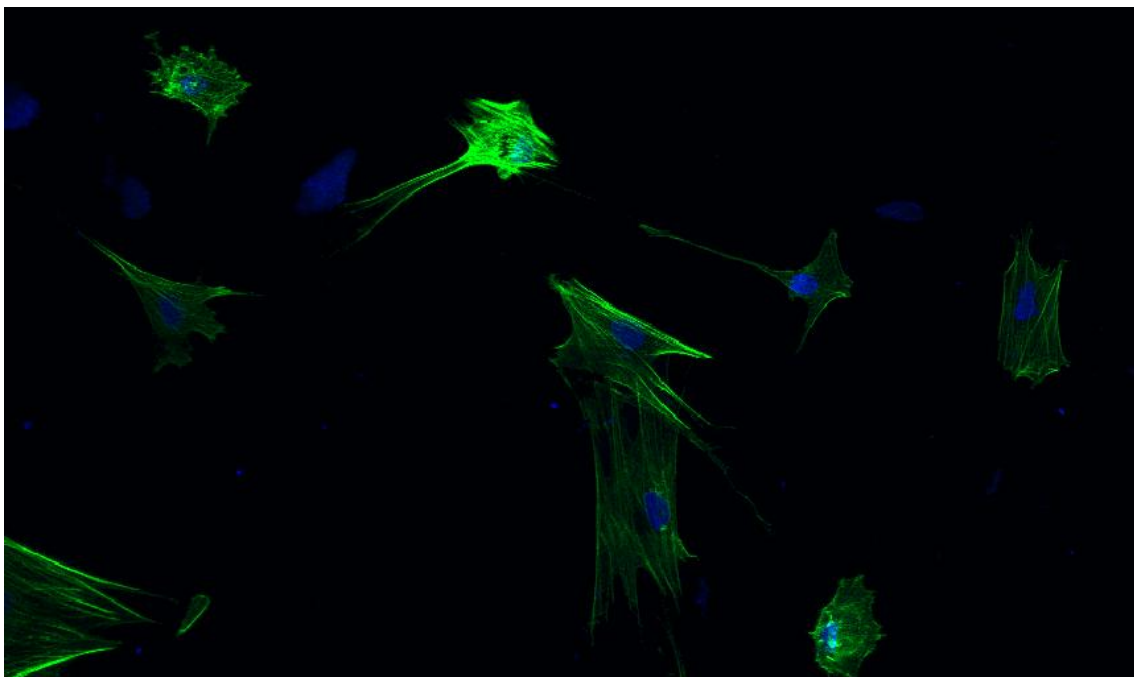


Figura 5.21. Confocal de la muestra 5B zoom 1.00.

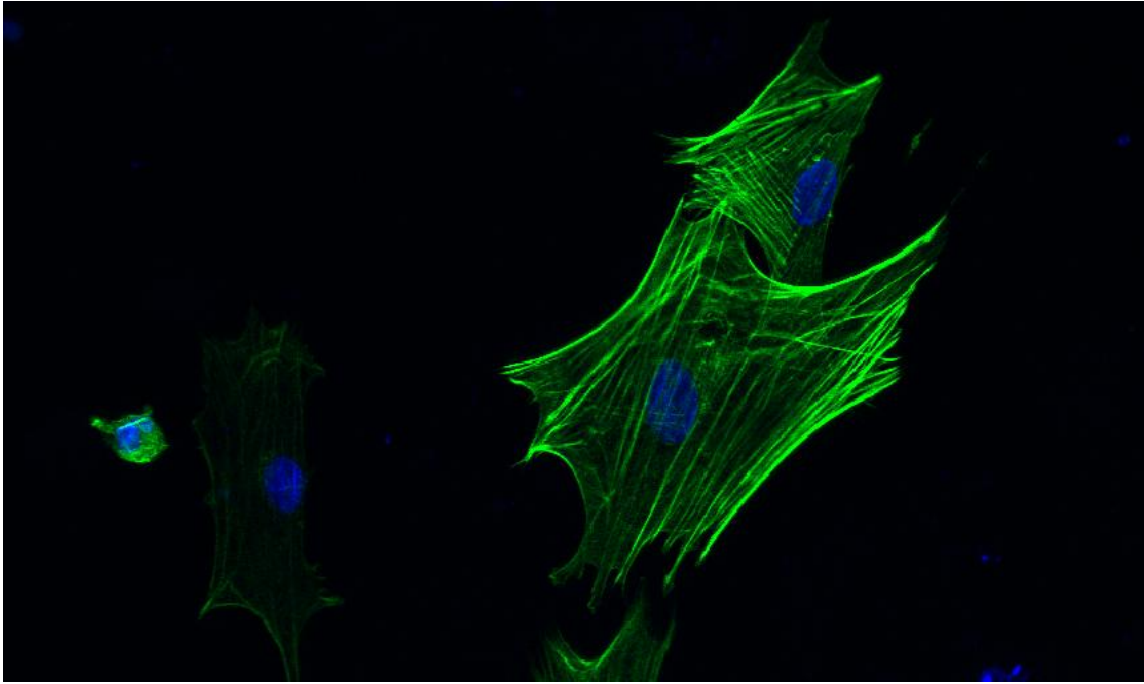


Figura 5.22. Confocal de la muestra 5B zoom 1.80.

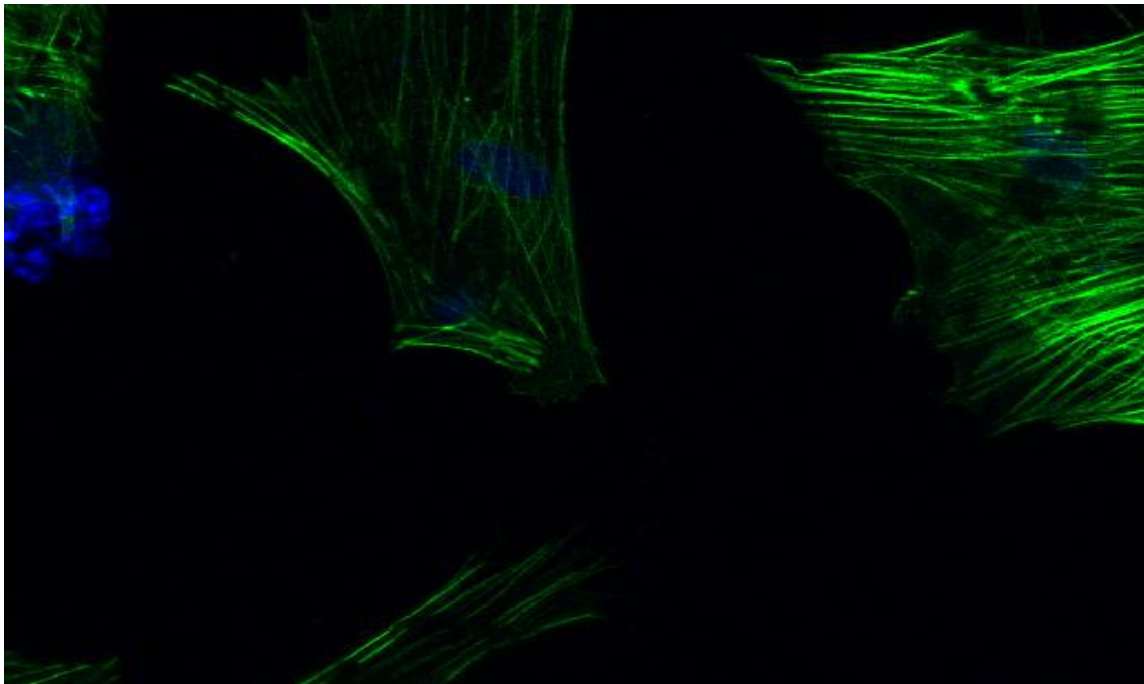


Figura 5.23. Confocal de la muestra 5B zoom 2.70.

5.7.3 Estudio de la adhesión y de la morfología mediante SEM

El estudio SEM corrobora que en las muestras 3 y 4 no hay células vivas, únicamente se puede apreciar células redondeadas que corresponden a las que están muertas, incluso algunas de ellas muestran un agujero en el centro, que podrían indicar que en un primer momento hubo anclaje, pero que finalmente sufrieron una perforación.

Muestras 3 y 4

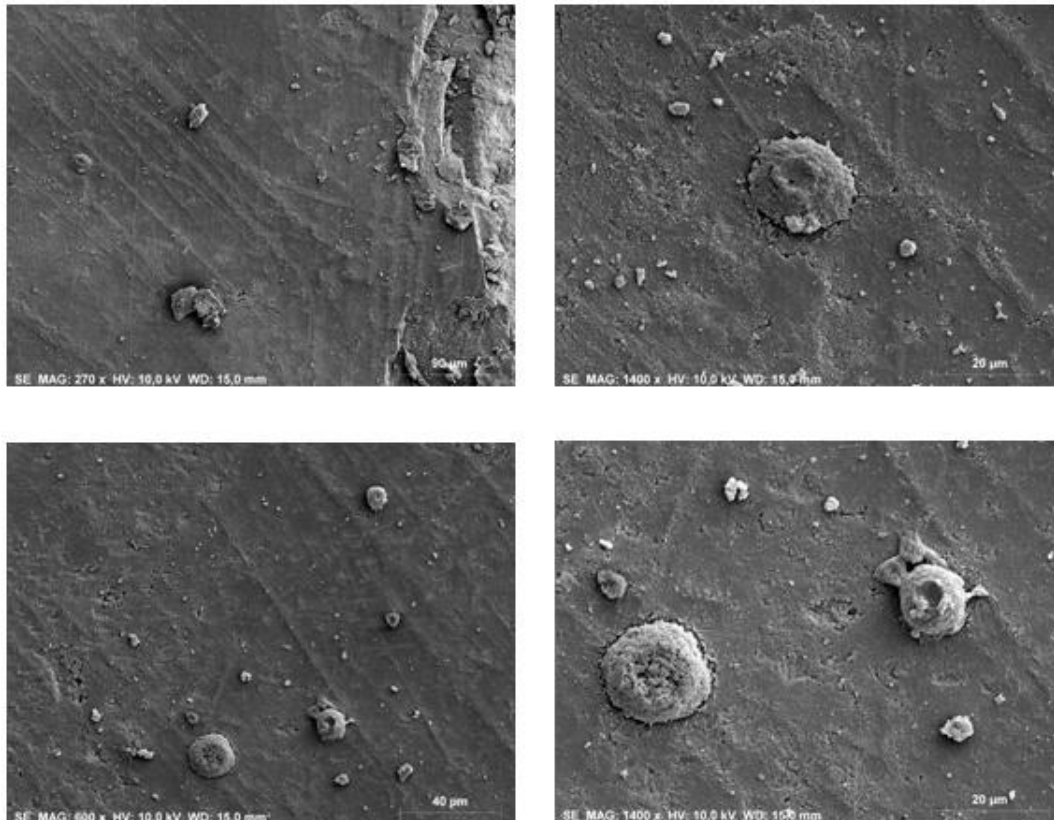


Figura 5.24. Imágenes SEM de la muestra 3.

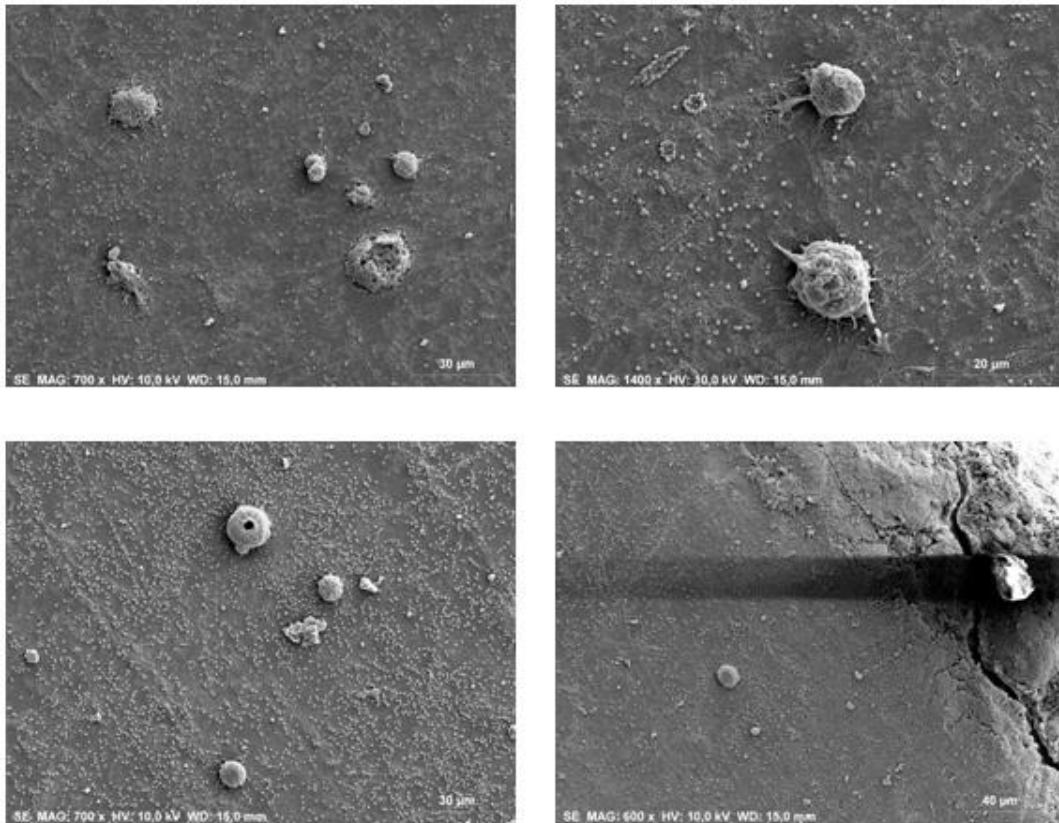


Figura 5.25. Imágenes SEM de la muestra 4.

Muestra 5B

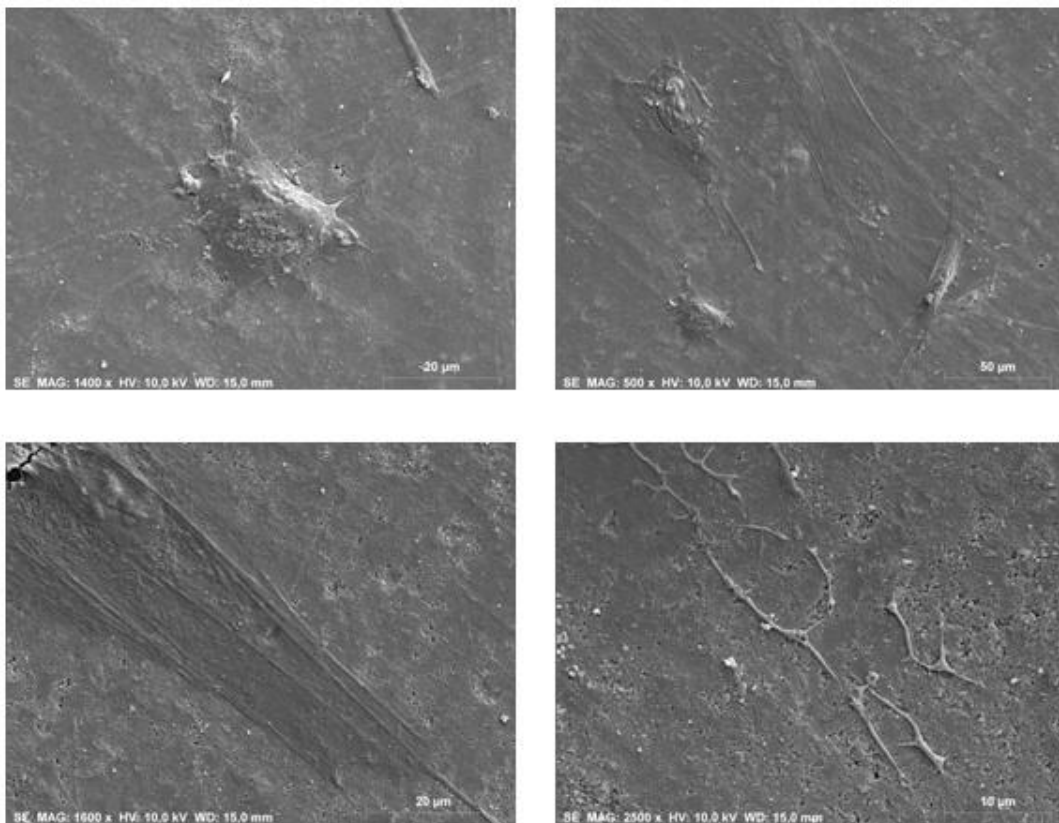


Figura 5.26. Imágenes SEM de la muestra 5B.

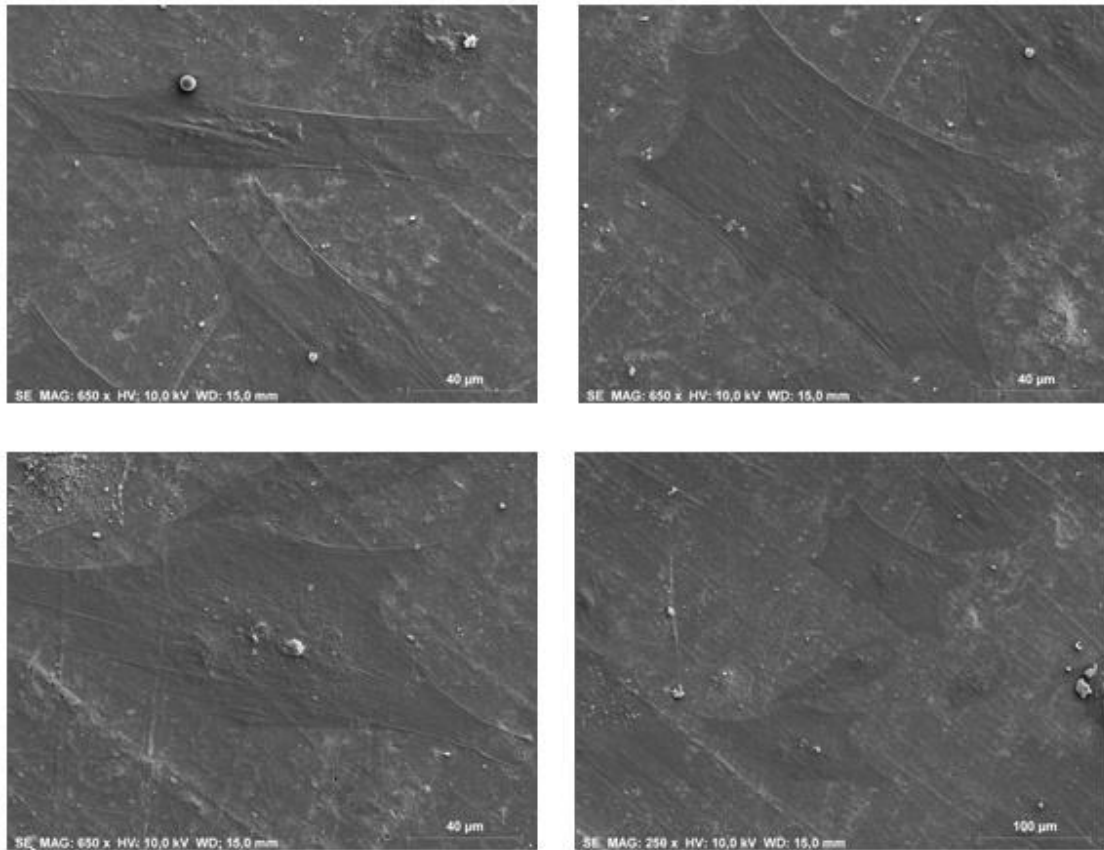


Figura 5.27. Imágenes SEM de la muestra 5B.

La muestra 5B es la única que presenta actividad celular, en las imágenes se observa que las células están totalmente pegadas a la muestra, e incluso se hace difícil distinguir cuando empieza la célula y cuando el material. Aunque el número de células es bajo se aprecia: Gran adhesión, gran expansión y pequeño tamaño en ellas. Ha sido necesario utilizar resoluciones muy altas para poder identificarlas.

En general los estudios no muestran buenos resultados a nivel de biocompatibilidad, lo que se puede atribuir al bajo contenido de apatito y/o presencia de otras fases secundarias, o que previamente al estudio es necesario someter las muestras a un proceso de lavado que evite que las células entren en contacto con restos no deseados que no pertenecen a la propia muestra, sino que pueden que se hayan depositado durante los procesos previos de síntesis o de preparación de muestras.

6. Conclusiones

El agua de mar favorece la síntesis de un carbonato-apatito, de composición idéntica al de una muestra de esmalte dental reportada en la bibliografía. Se ha demostrado que en presencia de agua de mar artificial sin diluir, se alcanza el mayor grado de pureza del biomaterial de carbonato-apatito. Ello nos permite aportar un proceso novedoso y de bajo coste de un biomaterial biomimético en composición, realizado en dos pasos: Síntesis a reflujo en presencia de agua de mar y purificación posterior con disolución diluida de ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) a temperatura ambiente.

En cuanto al estudio de biocompatibilidad, las muestras sintetizadas con relación Ca/P superior a la teórica 10/6 de hidroxiapatito, usada como composición de referencia, presentan baja o nula biocompatibilidad, mientras que la muestra purificada (muestra 5B) sintetizada con la relación Ca/P teórica, muestra una mejor biocompatibilidad, aunque el procedimiento usado para estudiar la viabilidad celular necesita una revisión de las diferentes etapas antes de la puesta en contacto con el cultivo celular. Aun así, aportamos un material biomimético susceptible de ser tratado mediante funcionalización bioquímica, por adición de proteínas específicas y factores de crecimiento, que facilitarían la correcta interacción con las células del cuerpo humano. Esto permitiría la osteointegración en procesos de restauración ósea. Así, mediante un conjunto de acciones, en el que se aúna el diseño de síntesis de biomateriales y la aportación de funcionalidad biológica, se puede obtener un producto biomédico, competente y necesario.

7. Bibliografía

Abraham, H.J. (2011): *A crystallinity study of dental tissues and tartar by infrared spectroscopy*, Springer, vol.399, pp.1699-1704.

Duffo, Gustavo (2011): *Materiales y materias primas. Biomateriales*, Buenos Aires, INET.

Elliott, J.C (2002): "Calcium phosphate biominerals", *The Mineralogical Society Of America*, pp. 48pp. 427–453.

Faig Martí, Joan (2008): "Los recubrimientos de hidroxiapatita en las prótesis articulares", *Revista Española de cirugía ortopédica y traumatología*, Elsevier, núm.2, vol.52, pp.113-120.

Fowler, B.O (1966): "Infra-red spectra of hydroxyapatite, octacalcium phosphate and pyrolysed octacalcium phosphate", *Archives of Oral Biology*, vol.1, pp.477-492.

García Garduño, Margarita y Reyes Gasga, José (2006): "La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica", *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, núm.2, vol.9, pp.90-95.

Gentile, Piergiorgio (2015): Process optimisation to control the physico-chemical characteristics of biomimetic nanoscale hydroxyapatites prepared using wet chemical precipitation, *Materials*, pp.2297-2310.

Gómez Ruiz, Santiago (2009): *Análisis Instrumental*, Netbiblo, vol.1.

Jepsen, Søren. (2008): "Clinical outcomes after treatment of intra-bony defects with an EMD/synthetic bone graft or EMD alone: A multicentre randomized-controlled clinical trial", NCB.

Kasaj, Adrian. (2008): "In vitro and in vivo characterization of porcine acellular dermal matrix for gingival augmentation procedures", NCB.

Kokubo, Tadashi (1991): "Bioactive glass ceramics: Properties and applications", *Biomaterials*, vol. 12, pp.155-163.

Kokubo, Tadashi (2006): "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?", *Biomaterials*, vol.27, pp.2907-2915.

Kong, L (2006): "A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering", *European Polymer Journal*, Elsevier, vol.42, pp.3171-3179.

Legeros, R.Z (2014): *Advances in Calcium Phosphate Biomaterials*, Springer, cap.1, pp.1-17.

Londoño, Marta (2006): “Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas”, *Revista EIA*, núm.5, pp. 109-118.

Ma, M et al. (2013): “Compression and structure of brucite to 31 GPa from synchrotron X-ray diffraction and infrared spectroscopy studies”, *American Mineralogist*, pp.33-40.

Sáenz Ramírez, Alejandro (2004): “Biomateriales”, *Revista de Tecnología en marcha*, núm.1, vol.17, pp.34-35.

Servicios Centrales de Investigación (SCAI): “Servicios”, SCAI.es, URL: <http://www.scai.uma.es/servicios/aqcm/spo/spo.html>.

Universidad de Barcelona (UB): “Materials”, ub.edu, URL: <http://www.ub.edu/cmematerials/es/content/hidroxiapatita>.

Vallet Regí, María (2011): “Biocerámicas: Evolución y aplicaciones”, *Real Sociedad Española de Química*, núm.1, pp.28-35.

Wilson, Rory (1999): “Rietveld refinement of the crystallographic structure of human dental enamel apatites”, *American Mineralogist*, vol.84, pp.1406-1014.

WordPress (2014): “Composición química del tejido óseo”, wordpress.com, URL: <https://blogunidad1.wordpress.com>.

WordPress (2013): “Tejidos dentarios”, wordpress.com, URL: <https://tejidosdentariosbesty.wordpress.com/page/2/>.

Agradecimientos

En primer lugar agradecer a Pascual Olivera Pastor, tutor del presente TFG, el tiempo invertido y sobre todo las mejoras y propuestas que ha ido aportando durante todo el procedimiento. Agradecer y hacer mención también del gran trabajo realizado por Silvia Claros Gil del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología que nos ha permitido dar un paso más.

Y por supuesto, a todas y cada una de las personas del Departamento de Química Inorgánica que en mayor o menor medida me han ayudado a realizar la parte de laboratorio. A Los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga por todos los servicios prestados, en especial a Laura León de la unidad de Difracción de Rx y a Rocío González de la unidad de Espectrometría atómica.