

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA INFORMÁTICA
INGENIERÍA DE LA SALUD

**PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
BIOMATERIALES HÍBRIDOS DE HIDROXIAPATITO CON
FOSFONATO (2-HIDROXI FOSFONOACETATO)**

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF
PHOSPHONATE-HIDROXYAPATITE HIBRID COMPOUNDS
FOR USE AS BIOMATERIALS**

Realizado por
Carmen Méndez Ramos
Tutorizado por
Pascual Olivera Pastor
Departamento
Química Inorgánica, Cristalografía y Minerología

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
MÁLAGA, Septiembre de 2015

Fecha defensa:
El Secretario del Tribunal

Resumen: El hidroxiapatito es el biomineral de los tejidos duros de los mamíferos y por ello ha sido ampliamente estudiado como biomaterial en cementos óseos, recubrimientos de metales implantables y scaffold en ingeniería de tejidos. En este trabajo, se estudia un proceso síntesis y caracterización de un derivado de este material, donde el ion fosfonato: 2-hidroxifosfonoacetato sustituye parcialmente al ion fosfato [1-10%]. El proceso de síntesis de hidroxiapatito consiste en dos etapas: (1) una reacción a 100°C entre el ácido fosfórico (añadido lentamente) y una mezcla de hidróxido de calcio + 2-hidroxifosfonoacetato de calcio (Relación Ca/P=1.67). (2) un tratamiento térmico de los sólidos obtenidos en (1) a 150°C. Los productos finales se han caracterizado mediante análisis químico, análisis termogravimétrico, difracción de rayos-X con análisis de Rietveld, microscopía SEM y determinación de la superficie específica y porosidad. En las fases cristalinas, el grado de pureza de los hidroxiapatitos oscila entre 91-100%. Todos presentan estructura monoclinica, en contraste con la estructura hexagonal que habitualmente se obtiene aplicando métodos de síntesis similares. Esta variación se atribuye a la presencia de fosfonato. El contenido de éste también influye en la morfología y en la porosidad de los materiales, siendo las muestras con más fosfonato las más porosas. Los materiales, al menos aquellos con una cantidad menor o igual 5% de fosfonato, muestran una biocompatibilidad similar a un material de hidroxiapatito de referencia.

Palabras Clave: Hidroxiapatito, Fosfonato, Biomaterial, Biocompatibilidad, Análisis de Rietveld.

Abstract: Hydroxyapatite is the biomineral of mammals' hard tissues and has therefore been extensively studied as a biomaterial in bone cements, coatings of implantables metals and scaffolds in tissue engineering. In this work, a synthesis procedure and characterization of hydroxyapatite derivatives containing 2-hydroxyphosphonoacetate substituting partially for phosphate group [1-10%] are reported. The hydroxyapatite synthesis process consists of two stages: (1) a reaction at 100 ° C between the phosphoric acid (added slowly) and a mixture of calcium hydroxide + 2-hydroxyphosphonoacetate calcium (Ca/P ratio = 1.67). (2) Heat treatment of the solids obtained in (1) at 150°C. The final products have been characterized by chemical analysis, thermogravimetric analysis, X-ray diffraction with Rietveld analysis, SEM and specific surface and porosity determinations. In the crystalline phases, the purity degree of the hydroxyapatites ranges from 91-100%. All hydroxyapatite structures were monoclinic, in clear contrast to the hexagonal symmetry, which is usually obtained using similar synthetic methods. This behaviour is attributed to the presence of phosphonate. The phosphonate content also influences the morphology and porosity of the materials, the phosphonate higher loading samples being the most porous solids. Materials with equal or lower amount of phosphonate than 5% showed similar biocompatibility to a reference hydroxyapatite material.

Keywords: Hydroxyapatite, Phosphonate, Biomaterial, Biocompatibility, Rietveld refinement

Índice

1. Introducción.....	1
Introducción histórica.....	1
Ortofosfatos de calcio.....	1
Hueso.....	3
Dientes.....	7
Biomateriales de fosfato de calcio.....	10
Hidroxiapatito (HA) denso y poroso.....	11
Injertos óseos.....	13
Implantes óseos.....	14
Electroforesis.....	15
Relleno facial.....	15
Acción farmacológica de los fosfonatos.....	15
2. Motivación y Objetivos.....	17
2.1 Motivación.....	17
2.2 Objetivos.....	17
3. Técnicas instrumentales.....	19
3.1 Análisis elemental C, N y H (CNH).....	19
3.2 Análisis térmico diferencial y termogravimétrico (ATD-TG).....	20
3.3 Difracción de rayos X.....	21
3.4 Análisis de Rietveld.....	22
3.5 Espectroscopía infrarroja (FTIR).....	23
3.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	23
3.7 Análisis de superficie.....	24
4. Materiales y Métodos.....	25
4.1 Reactivos.....	25
4.1.1 Preparación del reactivo hidroxifosfoacetato de calcio: Ca(HO ₃ PCHOHCOO)·3H ₂ O (CaHPAA).....	25
4.2 Muestras.....	26
4.2.1 Preparación de las muestras.....	26
4.2.1.1 Síntesis mecanoquímica.....	26
4.2.1.2 Síntesis por adición lenta de ácido fosfórico.....	26
4.2.2 Tratamiento térmico de las muestras.....	27

4.2.3	Preparación de pastillas	27
4.2.4	Caracterización de las muestras	27
4.2.4.1	Estudio de biocompatibilidad.....	27
5.	Resultados y Discusión	29
5.1	Síntesis de los materiales	29
5.2	Análisis químico	32
5.3	Difracción de Rayos-X	33
5.4	Morfología y superficie específica.....	37
5.5	Espectroscopía infrarroja	42
5.6	Estudio de biocompatibilidad	43
6.	Conclusiones.....	45
	Futuras líneas de trabajo	45
7.	Bibliografía	47
	Agradecimientos	51

1. Introducción

Dentro de la ingeniería biomédica, el uso de biomateriales cerámicos ha adquirido gran interés para reparación y/o reconstrucción de tejido óseo, aplicado en medicina regenerativa de tejidos. El biomaterial hidroxiapatito ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) y sus derivados presentan la ventaja de ser biocompatibles, bioactivos y bioabsorbibles, ya que su composición y estructura química se asemeja a la fase mineral contenida en el esqueleto.

Introducción histórica

El término apatito (del griego $\alpha\pi\alpha\tau\epsilon\iota\tau\epsilon$, apatein: “engañoso”) fue acuñado por el geólogo alemán Abraham Werner en 1788 al describir una serie de fosfatos minerales. A finales del siglo XVIII, los químicos Proust y Klaproth postulan que el apatito es el principal componente inorgánico de los huesos. La fórmula química del fluorapatito natural ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, FA) se determinó en 1873. En 1891, Gluck describe el uso del marfil, un fosfato de calcio de origen biológico, para la sustitución de articulaciones (**Epinette and Manley, 2004**). Posteriormente, **De Jong et al., (1926)** presentó, mediante difracción de rayos-X, la primera evidencia de la similitud de la sustancia inorgánica de los huesos con el mineral apatito.

Ortofosfatos de calcio

Todos los ortofosfatos de calcio están compuestos mayoritariamente por calcio (Ca^{2+}), fósforo y oxígeno (éstos dos en forma de anión ortofosfato, PO_4^{3-}). Los tres elementos químicos están entre los 20 más abundantes de la superficie terrestre: 47% (oxígeno), 3.3-3.4% (calcio) y 0.8-0.12% (fósforo). Muchos ortofosfatos de calcio contienen otros iones, tales como HPO_4^{2-} (hidrógenofosfato), H_2PO_4^- (dihidrógenofosfato), OH^- (por ejemplo, en $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) y/o agua incorporada (por ejemplo: $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Además de ortofosfatos, también existen metafosfatos (PO_3^-), pirofosfatos ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) y polifosfatos [$(\text{PO}_3)_n^{n-}$].

Los ortofosfatos de calcio son escasamente solubles o insolubles en agua a pH neutro o básico, pero son solubles en medio ácido. Los compuestos puros son de color blanco, de mediana dureza, mientras que los minerales naturales presentan color debido a impurezas. Los ortofosfatos de calcio (apatitos) formados biológicamente son los principales componentes de los tejidos calcificados de los vertebrados; mientras que los formados a través de procesos geoquímicos (fluorapatitos presentes en rocas sedimentarias denominadas fosforitas) son la materia prima para la producción de fertilizantes.

La estructura del hidroxiapatito se representa en la **Figura 1.1**:

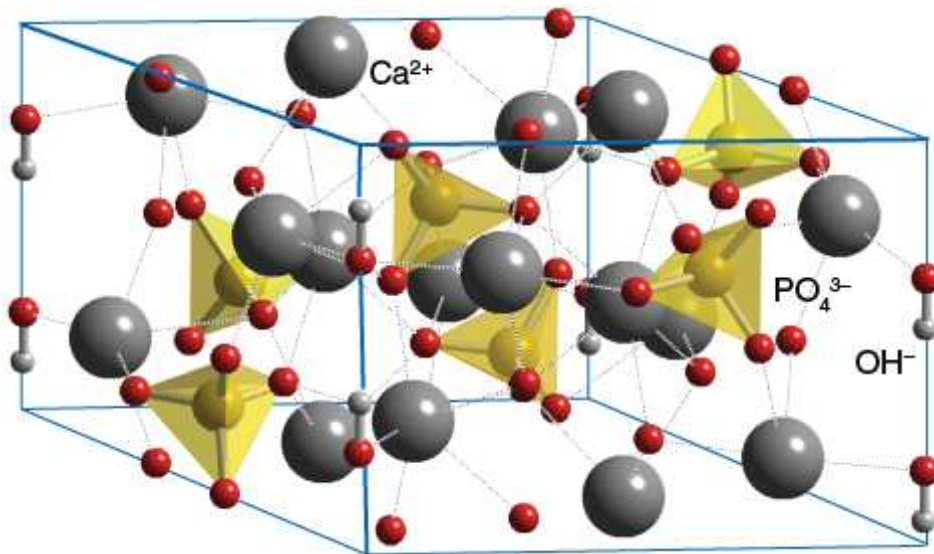


Figura 1.1 Estructura 3D del hidroxiapatito donde los iones Ca^{2+} están coordinados por OH^- y grupos PO_4^{3-} en dos entornos diferentes de coordinación: Ca1 (CaO^9) y Ca2 (CaO^7) <http://www.chemtube3d.com/solidstate/SShydroxyapatite.htm>

El hidroxiapatito (HA) es el segundo ortofosfato de calcio más estable y el menos soluble después del fluorapatito. La primera descripción detallada de la estructura del HA se presentó en 1964 (Kay et al., 1964) y su formación en disolución acuosa se interpretó en términos de agregación de clusters con estequiometría $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ (Posner and Betts, 1975). En la forma hexagonal, el grupo hidróxilo está orientado en dos direcciones distintas en cada columna mientras que en la forma monoclinica, obtenida normalmente a $T > 1000^\circ\text{C}$, se orientan en la misma dirección, alternándose en cada columna. Algunas impurezas, como la sustitución parcial de hidróxido por fluoruro o cloruro, estabilizan la estructura hexagonal del HA a temperatura ambiente. Por esta razón, el HA hexagonal pocas veces se encuentra en forma estequiométrica.

La estructura de apatito admite numerosas sustituciones en las posiciones del Ca^{2+} , del grupo fosfato y del ion OH^- , usualmente en cantidades pequeñas, pero pueden ser posibles en el intervalo completo de composición (disoluciones sólidas) entre algunos sustituyentes (por ejemplo, F^- y OH^-). Además, en algunas estructuras pueden aparecer defectos cristalográficos dando lugar a compuestos no estequiométricos. Excepto pequeñas partes del oído interno, todos los tejidos duros del cuerpo humano, incluso muchas calcificaciones patológicas, están constituidos por ortofosfatos de calcio, fundamentalmente en la forma de hidroxiapatito. Desde el punto de vista estructural, el apatito biológico es de baja cristalinidad, no estequiométrico y parcialmente sustituido con Na^+ , Mg^{2+} y carbonato (CO_3^{2-}), con cierto parecido al mineral natural dahllita.

Hueso

Los huesos humanos están compuestos por una fase mineral, hidroxiapatito, una fase orgánica, formada mayormente por colágeno tipo I y otros componentes minoritarios, y, finalmente, agua. Las proporciones relativas de estas fases varían con la edad, el sitio, el género y estado de salud (**Boskey, 2015**). La composición media de la masa total de un hueso de adulto es aproximadamente: 65% de hidroxiapatito, 25% de agua y 10% de matriz orgánica. (<https://depts.washington.edu/bonebio/ASBMRed/structure.html>). Como se refleja en la **Tabla 1.1** el calcio y el fósforo son elementos mayoritarios del hueso, lo que es previsible al ser los elementos principales del hidroxiapatito. El hueso, como la dentina de los dientes, tiene capacidad de auto-reparación a través de la intervención de sus células asociadas, que se clasifican en dos categorías según su función: osteoclastos que disuelven el hueso (resorción) y la familia de osteoblastos (osteoblastos, osteocitos y células de revestimiento), las cuales favorecen la formación y el mantenimiento óseo.

COMPOSICIÓN DEL HUESO DE LOS ADULTOS

CALCIO	34.8
FÓSFORO	15.2
SODIO	0.9
MAGNESIO	0.72
POTASIO	0.03
CARBONATOS	7.4
FLUOR	0.03
CLORO	0.13
PIROFOSFATOS	0.07
OTROS ELEMENTOS	0.04

Tabla 1.1 Además de la fase mineral, colágeno y agua, otras sustancias orgánicas minoritarias, como proteínas, polisacáridos y lípidos están presentes en la materia ósea. El colágeno del tejido óseo forma fibrillas de 100 - 2000nm de diámetro. El componente mineral del hueso es parecido al hidroxiapatito pero contiene además fluor, magnesio, sodio y otros iones como impurezas. (**Orlovskii et al., 2002**)

El tejido óseo es un tejido conectivo especializado que se caracteriza por su permeabilidad y vascularización además de una arquitectura compuesta por una parte externa compacta (cortical) y una parte interna esponjosa (trabecular). La estratificación células y las distintas capas del hueso se reflejan en la **Figura 1.2**:

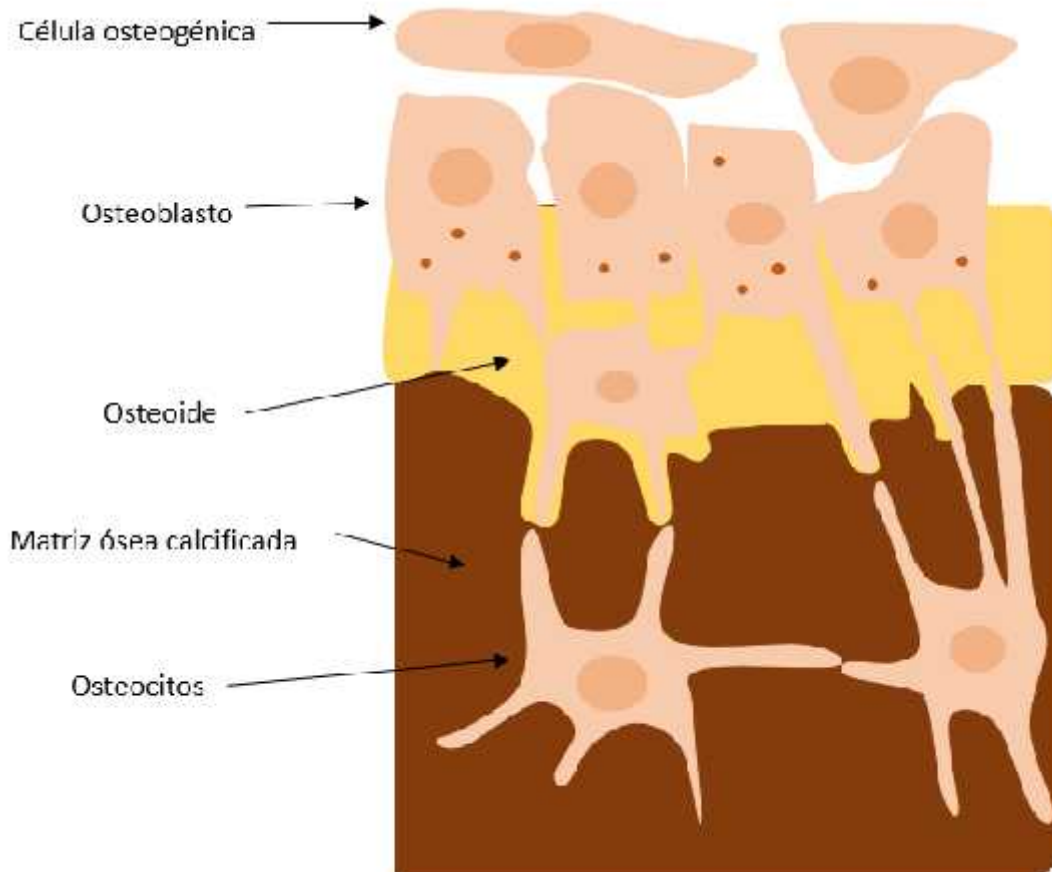
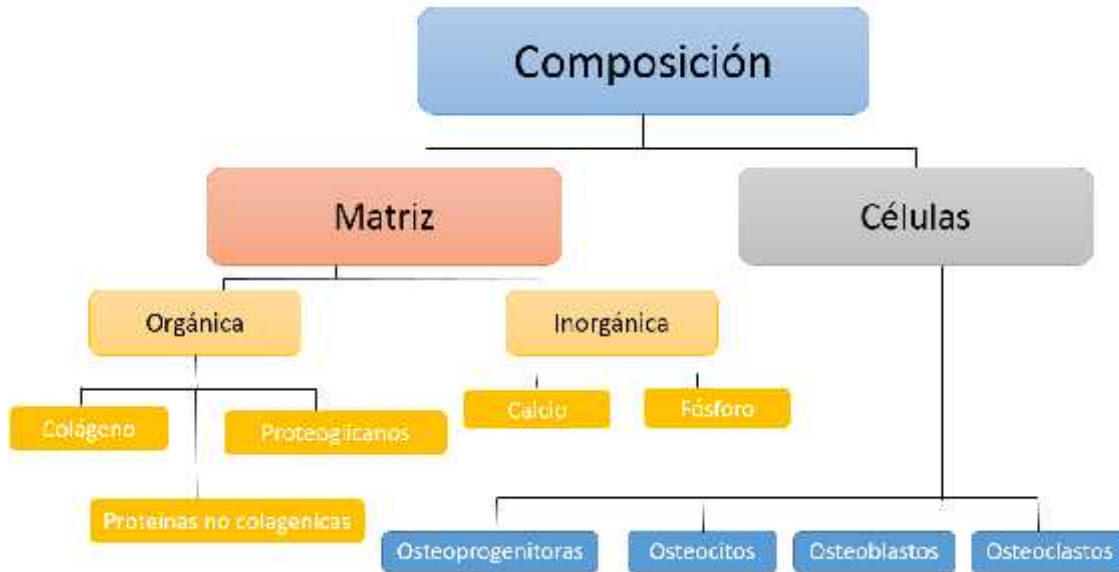


Figura 1.2 En el hueso se pueden diferenciar varios componentes: una matriz no calcificada, compuesta en su mayoría por colágeno tipo I y proteínas no colágenas, una matriz calcificada, formada fundamentalmente por cristales de calcio y fosfato (hidroxiapatito), y el componente celular, que representa un 2% de la materia orgánica, formado por osteoblastos, osteocitos, osteoblastos y células osteogénicas, que son las responsables de la formación, mineralización, modelación y remodelación óseas. Elaboración propia.

La matriz secretada inicialmente por los osteoblastos aún no está calcificada y recibe el nombre de osteoide. Este osteoide, al igual que es secretado por los osteoblastos también es degradado por ellos, ya que de este modo los osteoblastos pueden hacer un camino hacia la matriz para ir penetrando hacia la matriz calcificada. Los osteoblastos que llegan a la matriz calcificada se transforman en osteocitos y el resto mueren por apoptosis. Los osteocitos son las células óseas maduras que pueden comunicarse entre sí y con los osteoblastos a través de canales, llamados canalículos, que permiten la nutrición de los osteocitos. La función principal de estas células es el mantenimiento de la matriz ósea y la comunicación con los osteoblastos. Por último, los osteoclastos son células móviles de gran tamaño polinucleadas, encargadas de la reabsorción de la matriz calcificada. Se encuentran adheridos a la superficie ósea en zonas de resorción activa que forman unas cavidades llamadas lagunas de Howship. Los osteoclastos, a diferencia de los osteoblastos, provienen de otras células precursoras, presentes en la médula ósea. En el **Esquema 1** se indican los diferentes componentes del hueso.



Esquema 1.1 Componentes principales del hueso: la matriz ósea y las células óseas. Cada uno de estos componentes se subdivide en otros componentes primarios.

Las características mecánicas de los tejidos óseos están directamente relacionadas con las propiedades de la matriz que los compone. Esta matriz permite que los huesos sean resistentes a la par que flexibles, permitiendo así soportar una gran cantidad de carga sin romperse. Los componentes calcificados confieren gran resistencia a la compresión y tracción a la vez que las fibrillas de colágeno permiten un esfuerzo de torsión y de flexión pronunciado. La matriz no sólo tiene función de sostén sino que también cumple tareas metabólicas, de almacenaje de calcio y facilita la buena irrigación del tejido. Esta matriz ósea se compone de una fase mineral y una fase de matriz orgánica.

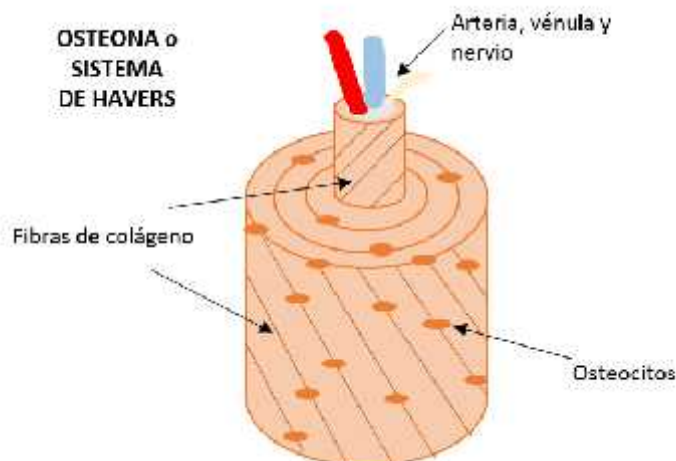


Figura 1.3 Osteona o Sistema de Havers. La mayoría de las laminillas están orientadas en forma concéntrica alrededor de los vasos que transcurren longitudinalmente y forman unidades estructurales cilíndricas, las osteonas o sistemas de Havers. En el corte transversal las osteonas tienen forma redondeada, oval o también irregular; en ocasiones son ramificadas. Su diámetro varía entre 100 y 400µm. Elaboración propia.

El componente orgánico del hueso representa del 30 al 35% de la totalidad del volumen del mismo (Hernandez, 2010). El colágeno de tipo I es el componente principal del material orgánico del hueso. En una laminilla de hueso maduro típico del adulto las fibras colágenas están organizadas paralelas entre sí pero su cantidad y sobre todo su orientación cambian en las laminillas contiguas (Figura 1.3). En las laminillas de una osteona las fibras colágenas transcurren en forma helicoidal alrededor del eje vascular de la osteona (Welsch and Sobotta, 2008). La función de las proteínas de la matriz como la osteocalcina, la osteopontina o la osteonectina entre otras sólo se conoce parcialmente, algunas desempeñan un papel en la mineralización mientras otras regulan la diferenciación de los osteoclastos.

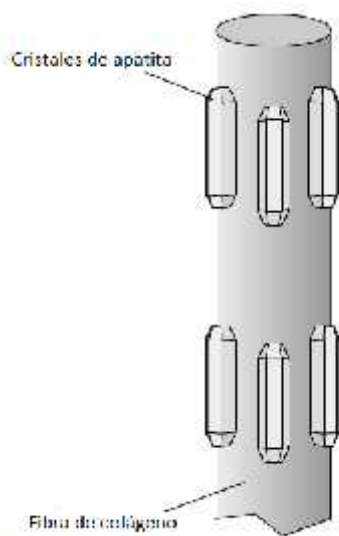


Figura 1.4 Los cristales de hidroxiapatito tiene una disposición muy regular en torno a las fibras de colágeno. La longitud de los cristales es de aproximadamente 40-60nm, 1.5-5nm de grosor y 20nm de ancho.

<http://www.doitpoms.ac.uk/tlpi/ib/bones/structure.php>

El material inorgánico consiste en depósitos de calcio, hidroxiapatito. Los cristales de hidroxiapatito miden unos 40-60nm de largo, 1.5-5nm de grosor y 20nm de ancho. La mineralización comienza en el colágeno (Figura 1.4), donde inicialmente se depositan los cristales de apatito en intervalos regulares. Aunque hasta el momento se desconocen los factores que determinan la mineralización in vivo, se supone que las proteínas óseas osteocalcina, osteonectina y osteopontina desempeñan un papel en la formación de apatito. Otro mecanismo de calcificación consiste en la formación de vesículas pequeñas que contienen apatito y surgen de la superficie de los osteoblastos. Además, en la matriz inorgánica hay iones citrato y carbonato. El grupo hidroxilo del apatito es parcialmente reemplazado por iones como fluoruro, carbonato y cloruro. Además también podemos encontrar magnesio y sodio, en sustitución de calcio (Ross and Pawlina, 2007).

Para que se produzca la mineralización se debe superar un nivel de concentración umbral de iones Ca^{2+} y PO_4^- en la matriz. La fijación de Ca^{2+} extracelular por la osteocalcina y otras sialoproteínas crea una concentración alta de este ion, este hecho estimula que los osteoblastos para que secreten fosfatasa alcalina, que aumenta la concentración local de iones de PO_4^- . Este proceso se retroalimenta positivamente ya que el aumento de PO_4^- a su vez estimula el aumento adicional de la concentración de Ca^{2+} en el lugar donde se iniciará la mineralización. A continuación los osteoblastos liberan pequeñas vesículas (de 50 a 200nm de diámetro) hacia la matriz ósea. Las vesículas matriciales contienen fosfatasa alcalina y pirofosfatasa que generan iones PO_4^- a partir de otras moléculas de la matriz, lo cual produce la cristalización de fosfato de calcio en la matriz que rodea los osteoblastos, en forma de hidroxiapatito. Por tanto, las vesículas matriciales son factores esenciales que regulan la mineralización del hueso, controlando el sitio donde se inicia el depósito mineral en el osteoide. Una vez que se han depositado los primeros cristales de

hidroxiapatito, éstos crecen con rapidez y se unen con los cristales próximos producidos alrededor de otras vesículas matriciales. ((Ross and Pawlina, 2007).

Dientes

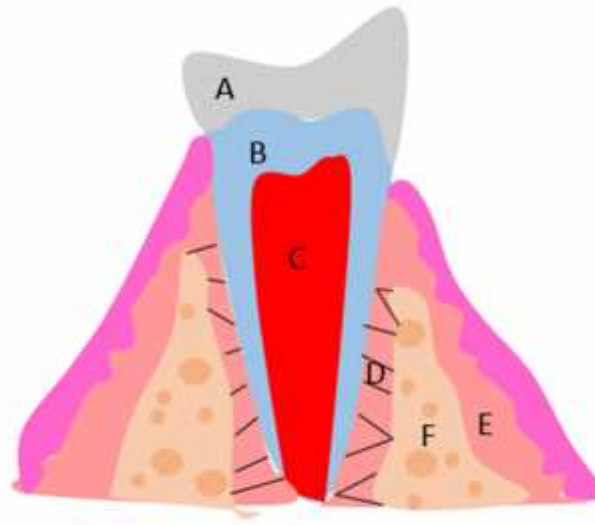


Figura 1.5 Estructura jerárquica del diente de los mamíferos. El esmalte (A) es la capa más superficial de la corona y se encuentra sobre la dentina (B). La pulpa (C) contiene los nervios y vasos sanguíneos mientras que el cemento (E) es la capa más externa de tejido mineralizado que rodea la raíz del diente permitiendo que el ligamento periodontal (D) fije el diente al hueso de la mandíbula (F). Elaboración propia.

Los dientes están formados por el esmalte, que es capa más superficial de la corona, la dentina en la parte inferior y el cemento que se encuentra en el área superficial de la raíz. El llamado ligamento periodontal fija el extremo cementado con el hueso alveolar como se describe en la **Figura 1.5** a través del cemento. La dentina y el hueso son similares en lo que respecta a su composición inorgánica (aproximadamente un 70% en peso y un 67% en peso respectivamente), el tamaño de cristal, su cristalinidad y composición orgánica, incluyendo los tipos de colágeno que los conforman (tipo-I y tipo-V). La dentina se caracteriza por la presencia de túbulos que albergan las principales proyecciones celulares de los odontoblastos (células formadoras de dentina). Los cuerpos celulares de los odontoblastos están alineados a lo largo del borde interior de la dentina, rodeando la pulpa dental. Los odontoblastos al principio forman la predentina, aún no mineralizada que consiste, sobre todo, en colágeno tipo I, proteoglucanos y glucoproteínas. La mineralización ocurre por depósito de cristales de hidroxiapatito. En este proceso al principio aparecen estructuras esferoidales (calcosferitas); las cuñas entre estas esférulas cálcicas se calcifican un poco más tarde. En la región de los cuellos dentarios, en la zona externa de la dentina muchas veces cesa esta calcificación de los espacios intermedios entre las esférulas, lo que da lugar a la llamada zona granulosa de Tomes, que se identifica como una estructura granular fina y corresponde a la “dentina interglobular” no mineralizada. La mineralización de la dentina se produce antes que la del esmalte (**Welsch and Sobotta, 2008**). Al avanzar la formación de la dentina los

cuerpos celulares de los odontoblastos se alejan de la membrana basal de los ameloblastos (células formadoras del esmalte) en dirección a la pulpa (**Figura 1.6**).

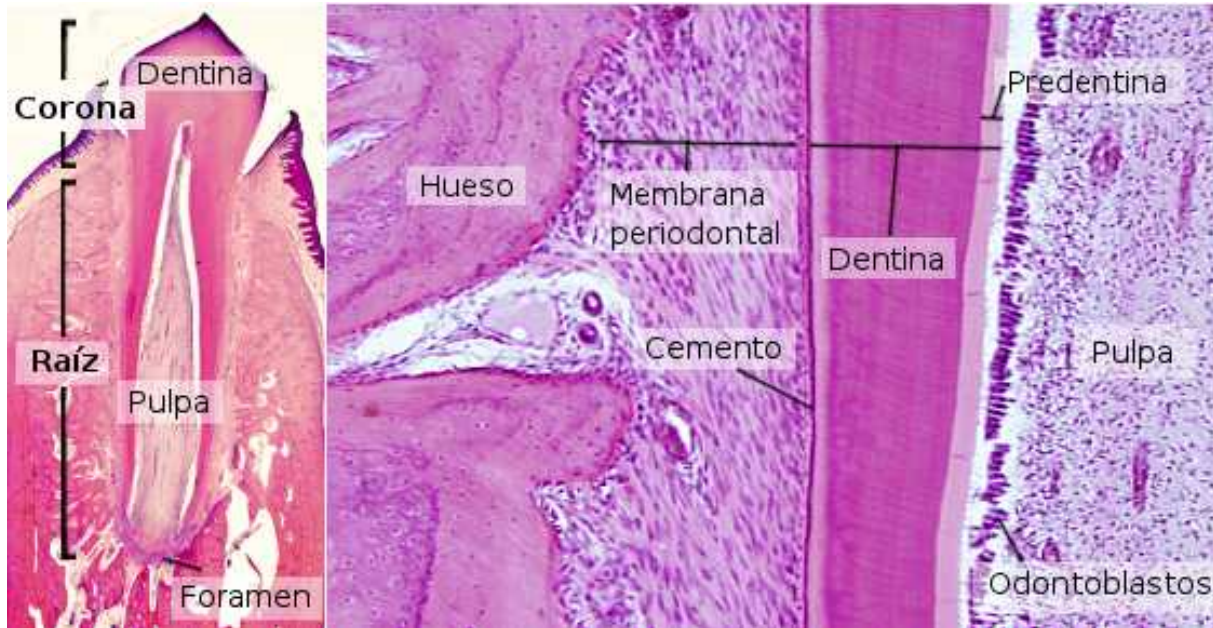
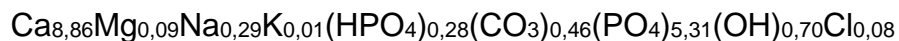


Figura 1.6 Secciones de diente de mamífero teñidas con hematoxilina-eosina. Atlas de Histología Vegetal y Animal Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo

El esmalte dental es un tejido único en el cuerpo porque es el más mineralizado (95- 97%, en peso, y menos del 1% de materia orgánica), es acelular y contiene los cristales de apatito más largos y más orientados de todos los tejidos mineralizados (**Simmer and Fincham, 1995**). El esmalte maduro es un carbonato-hidroxiapatito deficiente en calcio y con impurezas de iones de sodio, magnesio y cloro. Según (**Elliott, 1997**) su composición media es:



En comparación con la dentina, el esmalte se compone de cristales largos y estrechos (sobre 100nm de largo y 50nm de ancho) ensamblados en prismas paralelos (**Figura 1.7**), que forman intrincados patrones dispuestos oblicuamente a la superficie del diente.

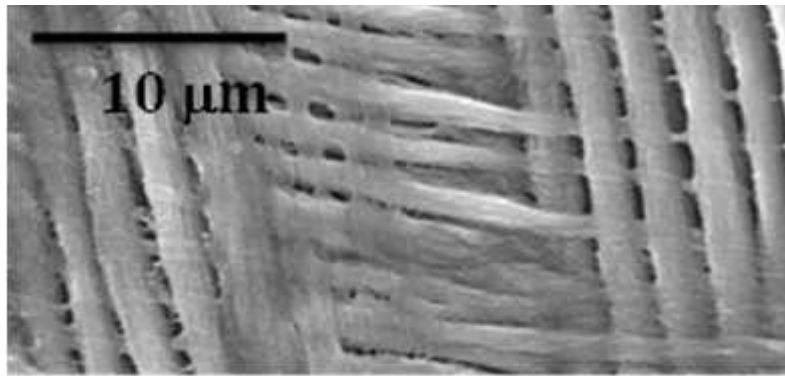


Figura 1.7 Cristales de esmalte dental ensamblados en prismas paralelos vistos por microscopía SEM. Adaptado de <http://gower.mse.ufl.edu/research.html#calbone>

Al ser acelular, en el esmalte maduro no se produce una reabsorción ni remodelación de la matriz mineralizada. Este hecho hace que una vez que se daña el esmalte no se puede regenerar de manera natural. Por esta razón, el esmalte es objeto de numerosos estudios desde enfoques biomiméticos y terapéuticos.

La formación del esmalte, también conocida como amelogenesis, solo tiene lugar durante el desarrollo dentario y es un proceso altamente regulado por las interacciones proteína-proteína, proteína-mineral y las que implican a la membrana celular. Los ameloblastos son las células encargadas de la producción del esmalte, sus ápices contienen sobre todo gránulos de secreción, lisosomas y vesículas claras formando una prolongación gruesa denominada proceso de Tomes. Por un proceso de exocitosis se liberan los gránulos y participan en el proceso de formación de la matriz orgánica del esmalte. En esta se depositan con rapidez los cristales de hidroxiapatita que se organizan en los ya mencionados prismas del esmalte y en el esmalte interprismático. Se forma esmalte únicamente en la zona superficial del ameloblasto en la que se encuentra el proceso de Tomes ((Welsch and Sobotta, 2008). Durante las etapas iniciales (fase secretora) de la formación del esmalte, los cristales del mineral del esmalte aparecen en forma de finas cintas alargadas, lo que sugiere que la mineralización del esmalte no tiene lugar dentro de una matriz preformada, como sucede en la mineralización producida en el hueso y la dentina. El último componente duro de los dientes es el cemento, muy parecido al hueso, también compuesto por una matriz calcificada, formada principalmente por colágeno tipo I y proteoglicanos.

Biomateriales de fosfato de calcio

Los fosfatos de calcio forman un conjunto de diferentes fases, la mayoría de las cuales han sido estudiadas como biomateriales (**Tabla 1.2**):

Fórmula, Abreviatura	Nombre	Relación molar Ca/P	Existencia en tejidos biológicos
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA	Hidroxiapatito	1.67	Hueso, dentina, esmalte, Cálculos dentales y urinarios, placas arterioescl
$\text{Ca}_{10-x}\text{H}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-x}$, CDHA	Hidroxiapatito deficiente en calcio	1.5	No encontrado
$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, OCP	Fosfato octacálcico	1.33	Cálculos dentales y urinarios
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, β -TCP	β -Fosfato tricálcico	1.5	Cálculos dentales y urinarios, Calcificaciones en tejidos blandos
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, α -TCP	α -Fosfato tricálcico	1.5	No encontrado
$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$, ACP	Fosfato de calcio amorfo	1.2-2.2	Calcificaciones en tejidos blandos
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, DCPD	Fosfato dicálcico dihidrato	1.0	Cálculos dentales y urinarios
CaHPO_4 , DCPA	Fosfato dicálcico anhidro	1.0	No encontrado

Tabla 1.2 Distintos tipos de fosfatos de calcio y su relación con tejidos biológicos

El desarrollo de materiales avanzados para aplicaciones biomédicas constituye uno de los ejes fundamentales de la ingeniería de materiales. El mayor potencial para la reparación y diseño de sustitutos óseos proviene de los materiales derivados de hidroxiapatito (Aoki, 1991), los cuales, por sus características intrínsecas, pueden desarrollar fuertes interacciones con el tejido óseo, tienen un destacado comportamiento osteoconductor, resisten la bioresorción y no muestran efectos adversos sobre el organismo humano. El comportamiento biológico de las cerámicas de hidroxiapatito depende de muchos factores, en particular de su historia química, microestructura y porosidad (Orlovskii et al., 2002). En la **Tabla 1.3**, mostrada a continuación, se comparan las propiedades mecánicas de hidroxiapatito con las del hueso cortical humano:

PROPIEDAD	HUESO CORTICAL HUMANO	HIDROXIAPATITO
DENSIDAD (G/CM ³)	1.5-2.0	3.16
MÓDULO DE YOUNG (GPA)	7-30	70-120
DUREZA (KNOOP)	130-170	2000-3500
RESISTENCIA A LA TENSIÓN (MPA)	50-150	40-100
RESISTENCIA A LA COMPRESIÓN (MPA)	100-230	100-900
RESISTENCIA A LOS FRACTURA (MPA M ^{0.5})	2-12	0.8-1.2

Tabla 1.3 Comparación de las propiedades mecánicas del hueso cortical humano y el hidroxiapatito (Helch and Wilson, 1999)

La naturaleza quebradiza del hidroxiapatito lo hace inadecuado para aplicaciones ortopédicas en las que se deban soportar grandes cargas. Sin embargo, para recubrimientos de implantes metálicos con fosfatos de calcio es posible combinar la resistencia mecánica del metal con la compatibilidad biológica del mineral. Los estudios clínicos han confirmado la eficacia de los implantes ortopédicos recubiertos con hidroxiapatito (Best, 2012)

Hidroxiapatito (HA) denso y poroso

Se han utilizado diversas técnicas de recubrimientos de metales con hidroxiapatito dependiendo de la microestructura deseada y propiedades del material. En implantes que deben resistir cargas mecánicas, la estrategia es usar cerámicas densas, con mejor resistencia que las cerámicas porosas. En este caso, las cerámicas contienen partículas de tamaño pequeño que, de acuerdo con la ecuación de Hall-Petch [1], da lugar a una mayor resistencia mecánica comparado con de materiales de tamaño de grano más grande

$$\sigma = \sigma_0 + bd^{-1/2} \quad [1]$$

donde σ_0 y b son constantes y d es el tamaño de grano.

Las características fundamentales de las cerámicas densas son la resistencia a la flexión, a la tensión y a la fractura. Los valores de la resistencia a la flexión, a la compresión y a la tensión se encuentran dentro de los intervalos 38-250, 120-150 y 38-300MPa respectivamente. La gran dispersión se debe a la distribución aleatoria de la carga y los efectos de la microporosidad residual, el tamaño del grano, las impurezas, etc. (Orlovskii et al., 2002)

El módulo de Weibull del hidroxiapatito denso oscila entre 5-18, característico de los materiales frágiles. El coeficiente de propagación de grietas se encuentra entre 26 y 80 en atmosferas secas y entre 12 y 49 en atmosferas húmedas indicando una gran sensibilidad de la propagación de grietas. (Orlovskii et al., 2002). El módulo de Young

del hidroxiapatito denso varía entre 35 a 120GPa, dependiendo de la porosidad residual y de las impurezas. El módulo de Young de la flexión se encuentra entre 44 y 88GPa. La resistencia al desgaste y el coeficiente de fricción es comparable con los del esmalte.

PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS TEJIDOS DUROS			
Tejido	Resistencia a la compresión, MPa	Resistencia a la tensión, MPa	Módulo de elasticidad, GPa
<i>Tejido cortical</i>	88-164	89-114	3.9-11.7
<i>Dentina</i>	295	52	18.2
<i>Esmalte</i>	384	10	82.4

Tabla 1.4 El hidroxiapatito denso tiene una resistencia a la flexión, a la compresión y a la tensión de 38-250, 120-150 y 38-300MPa respectivamente, que coinciden significativamente con las propiedades mecánicas del tejido cortical, aunque no así con las de la dentina y el esmalte. En cambio su módulo de Young es similar al del esmalte, así como su resistencia al desgaste y su coeficiente de fricción. (Orlovskii et al., 2002)

Entre las aplicaciones más importantes de HA denso se encuentran los dispositivos hipodérmicos para diálisis intestinal ambulante a largo plazo, la medida de la presión arterial y el azúcar en sangre y los exámenes ópticos de los tejidos internos. Las cerámicas densas de HA muestran una excelente biocompatibilidad con la piel, muy superior al de silicona caucho, material ampliamente utilizado para estos fines. (Hench, 1991)

El hidroxiapatito poroso es más atractivo que el hidroxiapatito denso para ciertas aplicaciones, como por ejemplo para el recubrimiento de superficies articulares o para dispositivos de liberación de medicamentos. Para asegurar el suministro de sangre y el crecimiento hacia el interior y la fijación del hueso, el diámetro de poros interconectados debe ser al menos 100-135 μ m. También son necesarios los poros más pequeños, que favorecen la adsorción de proteínas y adhesión de las células osteogénicas. Por lo tanto, la distribución de tamaño de poro en cerámicas porosas debe ser bimodal. (Wojciech Suchanek, 1997)

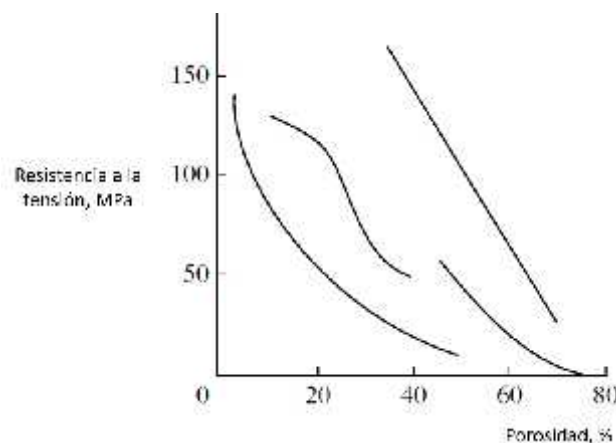


Figura 1.8 Resistencia a la tensión en función de la porosidad en los hidroxiapatitos. Adaptación de (Wojciech Suchanek, 1997)

Considerando que la resistencia a la compresión de la cerámica porosa es suficientemente alta (2-100 MPa), su resistencia a la flexión (2-11 MPa) es menor que el nivel necesario en un factor de 2-3. Con el aumento de la porosidad, la fuerza de la cerámica disminuye bruscamente (**Figura 1.8**). Los efectos de la porosidad P en la resistencia a la compresión y en el Módulo de Young E del HA cerámico producida por sinterización a 1.100°C se estudiaron en (**Metsger et al., 1999**). Tanto como E decrecieron a medida que aumenta la porosidad.

Injertos óseos

El injerto óseo es un procedimiento quirúrgico en el que se reemplaza una parte del hueso para de reparar fracturas o lesiones complejas, que suponen un riesgo para la salud del paciente o por falta de curación apropiada. El hueso tiene la capacidad de regenerarse pero, para ello, necesita una estructura soporte. Los injertos pueden ser autógenos o autoinjertos, (del propio paciente), aloinjertos (de un banco de huesos) y sintéticos (hidroxiapatito u otros materiales biocompatibles) con propiedades mecánicas similares a las del hueso (**Laurencin et al., 2006**). En la mayoría de los casos, los injertos se reabsorben a medida que el hueso va regenerándose. Para que el injerto cumpla su propósito debe reunir una serie de características: *osteoconducción* (capacidad de guiar el crecimiento del hueso en reparación), *osteoinducción* (favorecer la diferenciación celular para generar nuevos osteoblastos) y *osteoagénesis* (contribución de las células vivas del injerto a la remodelación del hueso). Esta última solo se da en autoinjertos y aloinjertos.

Recientemente se han desarrollado composites flexibles de hidrogeles con hidroxiapatito, con una composición mineral/matriz orgánica parecida a la del hueso humano. Además, se puede fabricar hueso artificial a partir de cerámicas, tales como fosfato de calcio (HA y fosfato tricálcico), bioglass y sulfato cálcico, que son biológicamente activas dependiendo de su solubilidad en el ambiente fisiológico. Estos materiales se combinan con factores de crecimiento, con iones como Sr^{2+} , que aumentan la densidad de masa ósea y la proliferación de osteoblastos, o se mezclan con médula ósea para incrementar la actividad biológica (**Kumar et al., 2013**).

Desde la década de los 80, diversos materiales cerámicos de HA han sido utilizados en cirugía ortopédica, dental o craneofacial (**Matsumine et al., 2004**). El HA poroso con una resistencia adecuada se ha estado investigando como un sustituto óseo ideal mucho tiempo (**Simon et al., 2008**) y (**Yoshikawa et al., 2009**). Recientemente se ha desarrollado una cerámica con porosidad interconectada adecuada para la ingeniería de tejido óseo, debido a que facilita la introducción de células mesenquimales, agentes osteotrópicos y la vascularización en los poros (**Yoshikawa et al., 2009**).

Implantes óseos

A la hora de elegir un material para implantes óseos se debe tener en cuenta las condiciones biológicas a las que va a estar sometido, las propiedades del mismo, la respuesta que se espera del material y, por supuesto, su coste. También se debe tener en cuenta que no produzca una respuesta inmune o rechazo, ya que el sistema inmune actúa sobre todo material externo que no sea biocompatible. La carcinogénesis en células colindantes al implante también debe ser considerada. Los materiales no sólo han de tener un mínimo impacto negativo en el cuerpo sino también que sean, a ser posible, bioactivos y ayuden al crecimiento y reparación de los tejidos. La idoneidad de las propiedades de los materiales dependen mucho del tipo de implante, ya que, por ejemplo, las propiedades mecánicas de una prótesis de rodilla son muy diferentes a las de cadera o codo. Por último, el coste es un factor clave a la hora de elegir los materiales a utilizar, ya que un precio muy elevado, aunque posea unas propiedades sobresalientes, hace inviable la comercialización del implante.

Para fijar las prótesis tradicionalmente se ha utilizado como cemento óseo un polímero, el polimetimetacrilato (PMMA), que permite distribuir la carga de manera más uniforme entre el hueso y el implante a la vez que fija este en su lugar. Sin embargo este material presenta algunos efectos secundarios notables. Por ejemplo, durante su endurecimiento (entrecruzamiento de las cadenas del polímero) se libera una gran cantidad de calor que puede causar necrosis en el hueso y alargar el periodo de recuperación.

Otra alternativa a la fijación con PMMA es recubrir la superficie del implante con una capa de material poroso, lo que fomenta la interacción con el tejido al permitir que el hueso crezca en los poros. Por tanto, favorece la osteointegración del implante, definido como “una conexión directa, estructural y funcional entre el hueso vivo, ordenado, y la superficie de un implante sometido a carga funcional”. (<http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/bones/structure.php>)

La función del hidroxiapatito (**Faig-Martí and Gil-Mur, 2008**) en las prótesis articulares consiste en acelerar el proceso de formación ósea. La capa de biomaterial de hidroxiapatito acelera la señalización celular y la adsorción de proteínas de la matriz extracelular, para después producirse la adhesión, proliferación y diferenciación de osteoblastos alrededor del material. En este tipo de prótesis recubiertas de HA se utiliza el metal, debido a la resistencia mecánica y tenacidad de éste (acero inoxidable, aleaciones de titanio o aleaciones de cromo-cobalto) con función específicamente estructural, y la capa bioactiva, cuya misión es hacer más rápida la fijación biológica de la prótesis.

El revestimiento se realiza a una temperatura elevada, pero tiene el inconveniente de que HA se enfría a distinta velocidad que el implante metálico, debido al mayor coeficiente de expansión térmica del primero con respecto a la mayoría de los materiales metálicos utilizados. Esto puede generar tensiones térmicas y causar agrietamiento de la superficie del implante, por ello se está estudiando nuevas

aleaciones metálicas, como las aleaciones con manganeso, para que los coeficientes de expansión térmica sean más coincidentes.

Electroforesis

EL hidroxiapatito tiene muchas más aplicaciones además de las ya mencionadas, en particular es muy útil para la purificación y el fraccionamiento cromatográfico del ADN. La doble hélice de ADN se une al hidroxiapatito con mayor fuerza que otras moléculas. Por tanto, puede aislarse fácilmente ADN a partir de una suspensión de material celular, haciéndolo pasar a través de una columna de hidroxiapatito. A continuación, se lava dicha columna con una disolución amortiguadora de pH de baja concentración en fosfato, para eliminar solo RNA y proteínas. Finalmente, el ADN se puede eluir con una solución más concentrada de fosfato. Además, el ADN de cadena simple se eluye del hidroxiapatito a una concentración menor de fosfatos que el ADN de doble hélice **(Voet and Voet, 2006)**.

Relleno facial

EL hidroxiapatito también se utiliza como relleno facial semipermanente **(Aced Jiménez et al., 2013)**. Para este tipo de aplicaciones el hidroxiapatito se presenta en gránulos de 25-45µm en un gel formado en una mezcla de agua, glicerina y carboximetilcelulosa. A pesar de las propiedades presentadas en los tejidos óseos no se describen calcificaciones ni osteogénesis en el área de inyección. Este tratamiento es efectivo en surcos y depresiones profundas como mejillas o mentón. En un primer momento el hidroxiapatito desempeña una función de relleno (0-3 meses), después, de manera indirecta, el aumento de volumen se produce debido a la formación de colágeno por parte de los fibroblastos. El hidroxiapatito puede perdurar 18-24 meses antes de ser reabsorbido.

Acción farmacológica de los fosfonatos

Químicamente, los fosfonatos y los ácidos fosfónicos son compuestos organofosforados que contienen grupos $[C-PO(OH)_2]$ o $[C-PO(OR)_2]$. Estas sustancias son poco solubles en disolventes orgánicos pero suelen ser bastante solubles en agua. Algunos bisfosfonatos sintéticos (con uniones químicas P-C-P) se han empleado desde hace tiempo como fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades de los huesos, entre otras la enfermedad de Paget, hipercalcemia maligna y osteoporosis **(Rodan and Fleisch, 1996)**. Estas sustancias ejercen un control en la formación y disolución de fosfatos de calcio in vitro, así como en la mineralización y resorción del hueso in vivo. Se unen fuertemente al mineral del hueso, hidroxiapatito, además el grupo P-C-P es resistente a la hidrólisis enzimática lo que explica por qué los bisfosfonatos se excretan sin alteración bioquímica.

La acción farmacológica clave de los bisfosfonatos es la inhibición de la resorción del hueso. El mecanismo de esta acción todavía no ha sido dilucidado y puede variar de un fosfonato a otro.

En el presente trabajo se ensaya una variante de la síntesis de hidroxiapatito convencional ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), incorporando cantidades variables de P como 2-hidroxifosfonoacetato ($\text{Ca}_2\text{H}_5\text{O}_6\text{P}$) (**Figura 1.9**) en distintas proporciones (1-10% molar), con respecto al P total, manteniendo las proporciones estequiométricas Ca/P del hidroxiapatito, es decir $\text{Ca/P} = 10/6$. El objetivo principal es estudiar la influencia de este fosfonato en las propiedades del hidroxiapatito, su compatibilidad química y su viabilidad en el uso médico. Esta sustancia no ha demostrado ningún efecto nocivo al medio ambiente, es muy barata y los productos de degradación química carecen de toxicidad (**Bazaga-Garcia et al., 2012**).

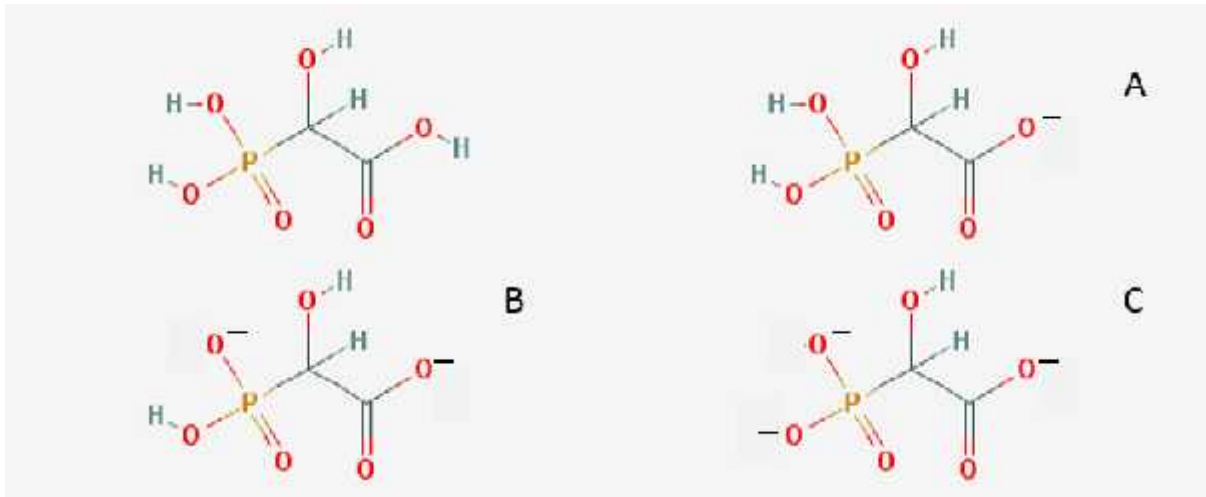


Figura 1.9 Ácido 2-hidroxifosfoacético (HPAA) y diferentes ligandos fosfonatos derivados del ácido (A, B y C)

2. Motivación y Objetivos

2.1 Motivación

Este trabajo es una introducción a la investigación en Ciencia de Biomateriales dentro del campo de la Ingeniería de la Salud. La importancia actual del hidroxiapatito ha quedado sobradamente demostrada por sus numerosas aplicaciones en biomedicina y sus propiedades farmacológicas. Aquí se estudia el efecto de la adición de un fosfonato (2-hidroxifosfoacetato) [1-10%] en las propiedades fisicoquímicas del hidroxiapatito y su biocompatibilidad de cara a evaluar sus posibles aplicaciones como biomaterial.

2.2 Objetivos

1. Preparar materiales derivados de hidroxiapatito para uso médico.
2. Determinar el papel estructural del fosfonato en la red de hidroxiapatito.
3. Estudiar la influencia del fosfonato: 2-hidroxifosfoacetato en las propiedades de hidroxiapatito y su compatibilidad química.
4. Estudiar la viabilidad de los materiales híbridos obtenidos

3. Técnicas instrumentales

3.1 Análisis elemental C, N y H (CNH)

El análisis elemental es una técnica que proporciona la cantidad relativa de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presente en un amplio rango de muestras de naturaleza orgánica e inorgánica tanto sólidas como líquidas. La técnica está basada en la completa e instantánea oxidación de la muestra mediante una combustión con oxígeno puro a una temperatura aproximada de 1000°C. Los diferentes productos de combustión CO₂, H₂O y N₂, son transportados mediante diferentes técnicas (columna cromatográfica, infrarrojos) y son medidos teniendo en cuenta el peso de la muestra y los datos obtenidos por la muestra patrón.

Equipo experimental:

Se han realizado los análisis elementales de CNH en un analizador Perkin-Elmer 240 (**Figura 3.1**) situado en los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la UMA: Para producir la combustión total de los compuestos, las muestras fueron calcinadas por encima de los 1000°C en una atmósfera rica en oxígeno.



Figura 3.1 Analizador Perkin Elmer 240

3.2 Análisis térmico diferencial y termogravimétrico (ATD-TG)

El análisis térmico diferencial y termogravimétrico consiste en estudiar la conducta térmica de una muestra con respecto a una muestra control, en nuestro caso Al_2O_3 , estable en condiciones de medida.

Este análisis implica un calentamiento de la muestra junto con la de referencia. El análisis térmico diferencial permite conocer si la muestra absorbe o libera energía durante el calentamiento:

- Procesos exotérmicos: Son debidos a reacciones o procesos que transcurren con desprendimiento de calor (oxidaciones, combustiones, reacciones químicas exotérmicas...) y se reflejan en la curva de ATD como máximos respecto a la línea base.
- Procesos endotérmicos: Son consecuencia de reacciones o procesos que absorben calor (pérdida de agua, transformaciones de fase, reacciones químicas endotérmicas...). Estas reacciones se muestran en la curva de ATD como mínimos respecto a la línea base.

El análisis termogravimétrico se define como la técnica en que se mide el peso de una muestra frente al tiempo o a la temperatura mientras se somete a la misma a un programa de temperatura controlado en una atmósfera específica. Una característica fundamental de la TG es que sólo permite detectar procesos en los que se produce una variación de peso tales como descomposiciones, sublimaciones, reducción, desorción, absorción, etc mientras que no permite estudiar procesos como fusiones, transiciones de fase, etc.

Equipo experimental:

El analizador utilizado para el análisis térmico de los materiales es el SDT-Q600 (**Figura 3.2**) de la firma TA Instruments con registro simultáneo de las curvas de análisis térmico diferencial (ATD), termogravimétrico (TF) y temperatura (T), en atmósfera de aire. Las condiciones empleadas fueron de temperatura ambiente hasta 1000°C y una velocidad de calentamiento de 10°C/min.



Figura 3.2 Analizador SDT-Q600

3.3 Difracción de rayos X

La técnica de difracción de rayos X (XRD) se utiliza para analizar cuantitativamente y cualitativamente las fases cristalinas de los materiales.

Se considera que los rayos-X son una forma de radiación electromagnética de muy alta energía y pequeña longitud de onda; del orden de los espacios interatómicos de los sólidos. Parte del haz de rayos-X que incide en un sólido se dispersa en todas las direcciones, debido a los electrones asociados a los átomos o iones que se encuentra en el camino, pero el resto del haz puede llegar a dar lugar al fenómeno de difracción de rayos-X, que tiene lugar si se cumplen las condiciones dadas por la Ley de Bragg y si existe una disposición ordenada de átomos. La Ley de Bragg [2] relaciona la longitud de onda de los rayos-X y la distancia interatómica con el ángulo de incidencia del haz difractado. Si no se cumple dicha ley la interferencia es de naturaleza no constructiva y el campo de haz difractado es de muy baja intensidad.

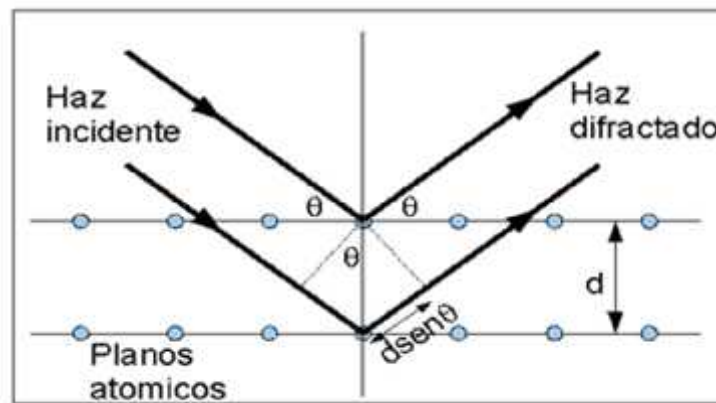


Figura 3.3 Dispersión de Bragg

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad [2]$$

Donde n es un número entero, λ es la longitud de onda del haz de rayos-X utilizado, d es la separación entre los planos del cristal y θ es el ángulo de incidencia de los rayos-X. Sólo cuando el ángulo de incidencia satisface la ecuación de Bragg se produce la difracción de rayos-X. La identificación de especies a partir del difractograma resultante está basada en la posición de las líneas de difracción y sus intensidades relativas.

Equipo experimental:

Los difractogramas de rayos-X de las distintas muestras se realizaron en un difractómetro automático PANanalytical EMPYREAN con detector PIXcel (**Figura 3.4**). Los difractogramas de rutina se tomaron usando una configuración de reflexión (Bragg-Brentano) con monocromador primario Ge(111), radiación incidente $CuK_{\alpha 1}$, y detector Z'Celerator. Las condiciones de medidas fueron: región angular entre 5 y 80° (2θ) y tamaño de paso de 0.033°.

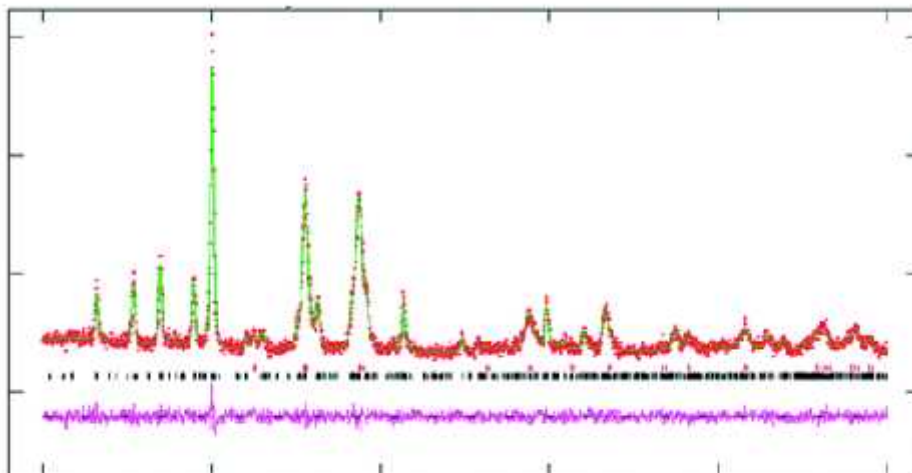


Figura 3.4 Difractómetro automático PANalytical EMPYREAN

3.4 Análisis de Rietveld

El método de Rietveld se basa en la comparación difractograma medido experimentalmente y otro calculado, tratando de minimizar la diferencia entre los dos variando una serie de parámetros. El afinamiento de Rietveld requiere un previo conocimiento de los datos de la estructura del cristal, tales como las posiciones atómicas.

Con un análisis de Rietveld es posible determinar la composición de fases en un material multifásico, la orientación preferente, los parámetros de red con precisión para un material dado, sustituciones atómicas en la estructura, el tamaño de los cristales, posibles microdeformaciones a partir del ensanchamiento de pico y, por último, la cantidad de material amorfo presente.



20

Figura 3.5 Ejemplo de afinamiento de Rietveld.

3.5 Espectroscopía infrarroja (FTIR)

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica que se emplea para obtener un espectro infrarrojo de absorción, emisión, fotoconductividad o dispersión Raman de un sólido, líquido o gas. Un espectrómetro FTIR recoge simultáneamente datos espectrales de alta resolución en un amplio intervalo del espectro. El término FTIR se origina por el hecho de los datos brutos se convierten en el espectro real utilizando una transformada de Fourier.

El objetivo de la espectroscopia de absorción es medir cómo absorbe una muestra la luz a cada longitud de onda, para ello se ilumina la muestra con haz de luz que contiene muchas longitudes de onda a la vez y se mide la cantidad que ha absorbido la muestra de ese haz. Este proceso se repite sucesivas veces para con diferentes combinaciones de frecuencias. Posteriormente se procesan los datos utilizando una transformada de Fourier.

Equipo experimental:

El espectro infrarrojo se obtuvo con un accesorio ATR MIRacle ATR de PIKE Technologies acoplado al espectrómetro FTIR FT/IR-4100 de JASCO. El rango del espectro obtenido se encuentra entre $4000\text{-}600\text{cm}^{-1}$ con una resolución de 4cm^{-1} .

3.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopia electrónica de barrido consiste en un conjunto de técnicas que relacionan la interacción de un haz de electrones que rastrea la superficie de la muestra con la misma. Se generan electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos X y electrones Auger, entre otros, para proporcionar información acerca de la topografía de la superficie, la composición y otras propiedades de la muestra que se desea caracterizar. Es preciso que las muestras sean conductoras para que la transmisión de electrones sea correcta. Una serie de electroimanes que conforman las lentes del detector miden la cantidad e intensidad de electrones devueltos por la muestras y forman con dicha información una imagen 3D. La resolución de los microscopios electrónicos de barrido se encuentra entre 4 y 20nm, dependiendo del equipo.

Equipo experimental:

Se lleva a cabo el análisis de nuestras muestras en el microscopio electrónico de barrido FEI Quanta FEG 250 (**Figura 3.6**) del Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología BIONAND. Se han utilizado distintas configuraciones del equipo en función de la magnificación y resolución deseada, utilizando un detector LFE, aunque mayoritariamente se ha utilizado una configuración a bajo vacío con una presión de 50Pa, un voltaje de 5KV y un spot 3.



Figura 3.6 Microscopio electrónico de barrido FE Quanta FEG 250

3.7 Análisis de superficie

El análisis de superficie consiste en caracterizar la superficie porosa de los sólidos y la quimisorción. Gracias a este análisis se determinan el área superficial, tanto interna como externa, la distribución, el volumen y el tamaño de poro. El método utilizado para el análisis de superficie es el BET ([Brunauer et al., 1938](#)). Este método asume que el nitrógeno a baja temperatura (77K) va a ser absorbido por las superficies sólidas limpias y llenará toda la superficie del sólido formando capas múltiples. La ecuación BET permite el cálculo de la superficie el sólido.

Equipo experimental:

El análisis de nuestras muestras se lleva a cabo en el equipo automático MICROMERITICS ASAP 2020 del SCAI. El equipo genera las isotermas de adsorción-desorción de N_2 a 77K, que se desarrollan variando la presión relativa (P/P_0) del gas a una temperatura constante y registrando el volumen de gas absorbido en la superficie del sólido.



Figura 3.7 Equipo MICROMERITICS ASAP 2020

4. Materiales y Métodos

4.1 Reactivos

Para la síntesis de los materiales de apatito, se emplearon los siguientes productos comerciales:

- **Hidróxido de calcio**
Ca(OH)₂, Vetec, 97%, 3% de CaCO₃
- **Fosfato dicálcico**
CaHPO₄, Aldrich, 99%
- **Ácido fosfórico**
H₃PO₄, Vetec, 85%
- **Fosfato de potasio monobásico**
KH₂PO₄, Vetec, 98%
- **Ácido 2-Hidroxifosfonoacético (HPAA), 50%**
Biolab. Densidad=1.3Kg/mL.

Además se elaboró en el laboratorio el reactivo **hidroxifosfoacetato de calcio**.

4.1.1 Preparación del reactivo hidroxifosfoacetato de calcio: Ca(HO₃PCHOHCOO)·3H₂O (CaHPAA)

Para la preparación del reactivo hidroxifosfoacetato de calcio Ca(HO₃PCHOHCOO)·3H₂O (10 g) se ha seguido el procedimiento descrito en la bibliografía ([Colodrero et al., 2011](#)) que básicamente consiste en hacer reaccionar en medio acuoso una sal de calcio (Ca(NO₃)₂·4H₂O o CaCl₂) con el ácido fosfónico H₂O₃PCHOHCOOH (HPAA) en proporciones estequiométricas y ajustando el pH a 2 con KOH conc. El sólido obtenido se filtró al cabo de tres días y se lavó con agua destilada varias veces hasta pH próximo a la neutralidad. El rendimiento fue del 63.42%.

4.2 Muestras

4.2.1 Preparación de las muestras

En la síntesis de los materiales de apatito se ha empleado distintos porcentajes de fosfonato (**Tabla 4.1**) en relación con el fósforo total de las muestras, para comprobar el efecto del fosfonato en las propiedades de los productos resultantes.

Muestra	(Fosfonato/P total) x100
AP-1%	1
AP-3%	3
AP-5%	5
AP-7%	7
AP-10%	10

Tabla 4.1 Proporciones de fosfonato/fósforo total en las distintas muestras

4.2.1.1 Síntesis mecanoquímica

Los reactivos se mezclaron en un molino planetario Fritsch Pulverisette 7 (**Figura 4.1**) aplicando ciclos de molienda de 30 min durante 24 h, con periodos de reposo de 2 min., manteniendo la proporcionalidad estequiométrica dada en la ecuación [3]. La molienda se realizó en reactores cerámicos con bolas de circonita (ZrO₂).

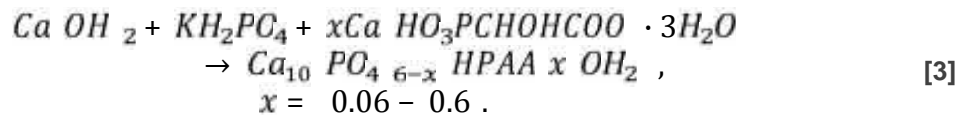
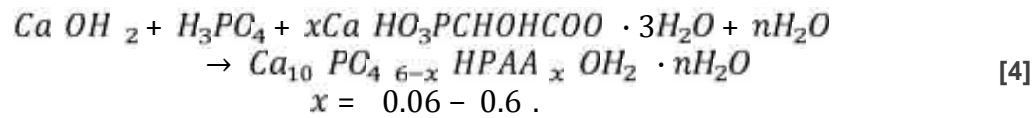


Figura 4.1 Molino planetario Fritsch Pulverisette 7

4.2.1.2 Síntesis por adición lenta de ácido fosfórico

Valoración lenta (gota a gota) de una mezcla de Ca(OH)₂ y CaHPAA con H₃PO₄(85%) a 90-100°C, en proporciones estequiométricas [4]. Una vez finalizada la reacción, los sólidos se separaron por centrifugación a 8000 rpm. A continuación se lavaron con agua destilada hasta pH neutro del agua de lavado y se secaron en estufa a 60°C.



4.2.2 Tratamiento térmico de las muestras

Las muestras sintetizadas por adición lenta de ácido fosfórico fueron sometidas a dos tratamientos térmicos:

- *Secado a 60°C*: Se lleva a cabo en una estufa durante aproximadamente 24 horas tras la centrifugación y el lavado de las muestras. Muestras **AP-1%-60** a **AP-10%-60**.
- *Tratamiento térmico a 150°C*: Este tratamiento se realiza en horno durante 24h para eliminar el exceso de agua de las muestras existente tras el secado a 60°C. Este tratamiento no produce degradación de fosfonato presente en las muestras. Muestras **AP-1%-150** a **AP-10%-150**.
- *Tratamiento térmico a 900°C*: Se realiza la calcinación a esta temperatura por 1 hora para eliminar todos los componentes volátiles y la materia orgánica y poder estudiar así su efecto. Muestras **AP-1%-900** a **AP-10%-900**.

4.2.3 Preparación de pastillas

Para la realización del estudio de biocompatibilidad, así como obtener imágenes SEM, se preparan las muestras en forma de pastillas, para una mayor comodidad en su manipulación.

Para el estudio de biocompatibilidad se preparan tres pastillas de cada muestra tratada a 150 grados, teniendo un total de 15 pastillas de 5mm de diámetro y con unos pesos comprendidos entre 0.0988 y 0.0706g. Se aplica una fuerza de 2 Pa en repetidas ocasiones para asegurar la compactación de las pastillas. Para el análisis de microscopía SEM se prepararon de pastillas de las muestras tratadas a 150°C y de las muestras **AP-10%-60** y **AP-10%-900** de igual tamaño y peso.

4.2.4 Caracterización de las muestras

4.2.4.1 Estudio de biocompatibilidad

El estudio de biocompatibilidad se lleva a cabo con los sólidos **AP-X%-150**. En la primera parte del proceso se preparan y esterilizan las muestras. Para la esterilización son tratados nuevamente a 150°C. Las muestras en forma de pastillas estériles (se ponen en presencia de células mesenquimales de rata durante 3 días a 37°C con una humedad del 90% y un 5% de CO₂. Utilizamos 80000 células por cada muestra, incluyendo la muestra control de HA, en 3 ml de medio formado por 10% de suero, 1% de penicilina y esterotomicina, 0.5% de fungizona, 1.25% de glutamina y 87.25% de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium).

Todo este proceso se realizó en el departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología bajo la supervisión de J. A. Andrades Gomez y de S. Claros Gil.

5. Resultados y Discusión

5.1 Síntesis de los materiales

Es bien conocido que, desde un punto de vista estructural y químico, el hidroxiapatito es el material más similar al componente mineral de huesos y dientes. Por lo cual, el desarrollo de nuevas técnicas preparativas y la introducción de innovaciones en sus propiedades, con vistas a su aplicación en el campo de la biomedicina, son objetivos prioritarios. Por esta razón, se intentó, en primer lugar, obtener hidroxiapatito por síntesis mecano-química. Este procedimiento es atractivo porque evita el uso de disolventes y temperaturas de síntesis elevadas. El procedimiento se basa en una reacción de estado sólido, mediante molienda en molino de bolas, de una mezcla de los reactivos: Ca(OH)_2 (hidróxido de calcio), CaHPAA (2-hidroxifosfonoacetato de calcio) y $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (hidrogenofosfato de calcio dihidrato). Después de 24 h de molienda, los reactivos seguían prácticamente intactos, sin apenas aparición del producto deseado. Por consiguiente, se modificaron las condiciones de síntesis con el objeto de obtener el producto de hidroxiapatito con un alto rendimiento. Para ello, se aplicó una variante del método recomendado por **Mcdowell et al., (1977)**.

El método utilizado en este trabajo para la síntesis de los materiales de hidroxiapatito, conteniendo cantidades variables de fosfonato (1, 3, 5, 7 y 10%, en moles respecto del fósforo total), consiste básicamente en gotear lentamente desde una bureta una disolución diluida de H_3PO_4 sobre una suspensión acuosa que contiene una mezcla de Ca(OH)_2 y CaHPAA, mientras se agita vigorosamente. La relación molar final Ca/P fue la estequiométrica, es decir $\text{Ca/P} = 10/6 = 1,67$. Para obtener un alto rendimiento de hidroxiapatito, la temperatura durante la reacción se mantuvo muy próxima a 100°C (**Boanini et al., 2010**).

Después de la reacción, los sólidos se separaron por centrifugación y se lavaron 3 veces con agua destilada. A continuación se secaron en estufa a 60°C . Una vez secos, los sólidos se sometieron a diferentes análisis de rutina con el fin de determinar su grado de pureza y su contenido de agua. En la **Figura (5.1)** aparece el difractograma de una muestra representativa de los productos obtenidos en estas condiciones. Los resultados indican que el producto es una mezcla de dos fases cristalinas: hidroxiapatito y brusita ($\text{Ca(HPO}_4\text{)} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Este último es un fosfato de calcio de naturaleza ácida, que se forma cuando el pH de la reacción no se mantiene suficientemente alto. No se estableció ningún control de pH con el objeto de no añadir iones extraños al medio de reacción. Consecuentemente, no es de extrañar esta mezcla de fases.

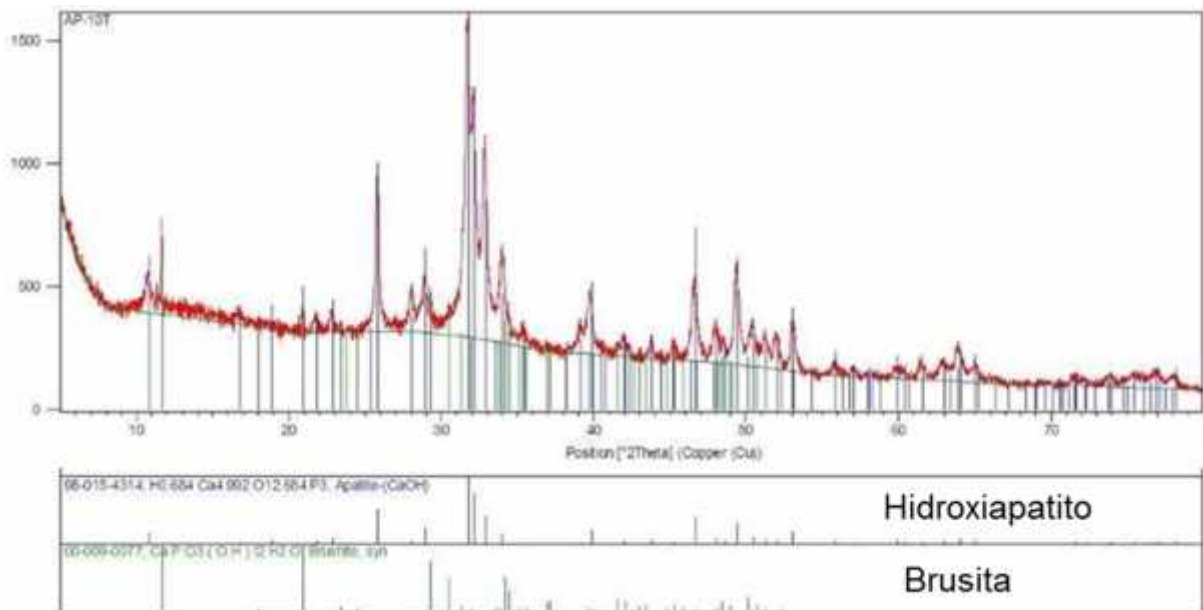


Figura 5.1 Difractograma de la muestra AP-10%-60 en el que se observan las líneas de difracción características tanto de apatito como de brusita

Con el objeto de incrementar aún más el rendimiento en hidroxiapatito, se decidió someter los sólidos a un tratamiento térmico a 150°C. Así, el mineral brusita, por su naturaleza reactiva, reacciona con la fracción amorfa que contiene el material y aumenta a su expensa la fase de hidroxiapatito. Esta temperatura se considera adecuada puesto que además se elimina agua, disminuye la fracción amorfa y es suficientemente baja para no degradar el ligando de fosfonato presente en el producto.

Los materiales tratados a 150°C son denominados a partir de aquí con el acrónimo **AP-X%-150** para distinguirlos de los recién sintetizados que se mencionarán como: **AP-X%-60**, donde X representa el porcentaje molar de fosfonato (con relación al fósforo total) y el segundo número indica la temperatura a la que se trataron los sólidos preparados.

En las **Figuras 5.2 y 5.3** se muestran las curvas de análisis termogravimétrico (TG) de los materiales **AP-1%-60** y **AP-10%-60** obtenidos. A partir de este análisis se observa un diferente grado de hidratación de las muestras, que depende no solo de la composición de las mismas, sino también de su exposición a las condiciones ambientales. Por tanto, las muestras de referencia en las que nos centraremos a partir de ahora serán las denominadas **AP-X%-150**, las cuales tienen una composición constante, menos agua y son más puras en hidroxiapatito.

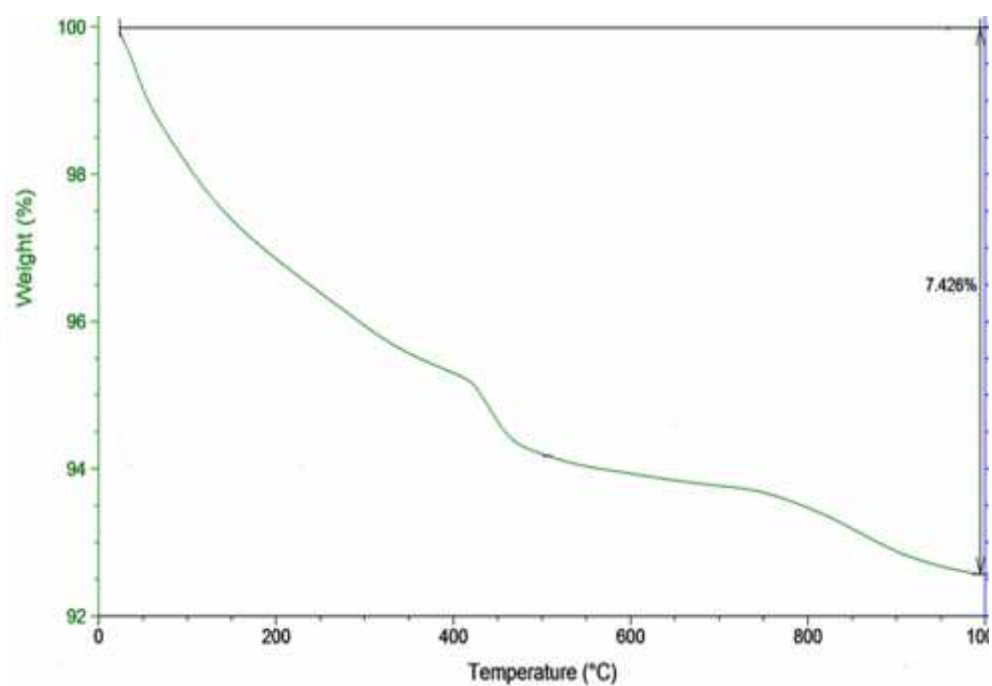


Figura 5.2 Curva TG correspondiente al material AP-1%-60 mostrando un 7,43 % de pérdida de masa a 1000°C.

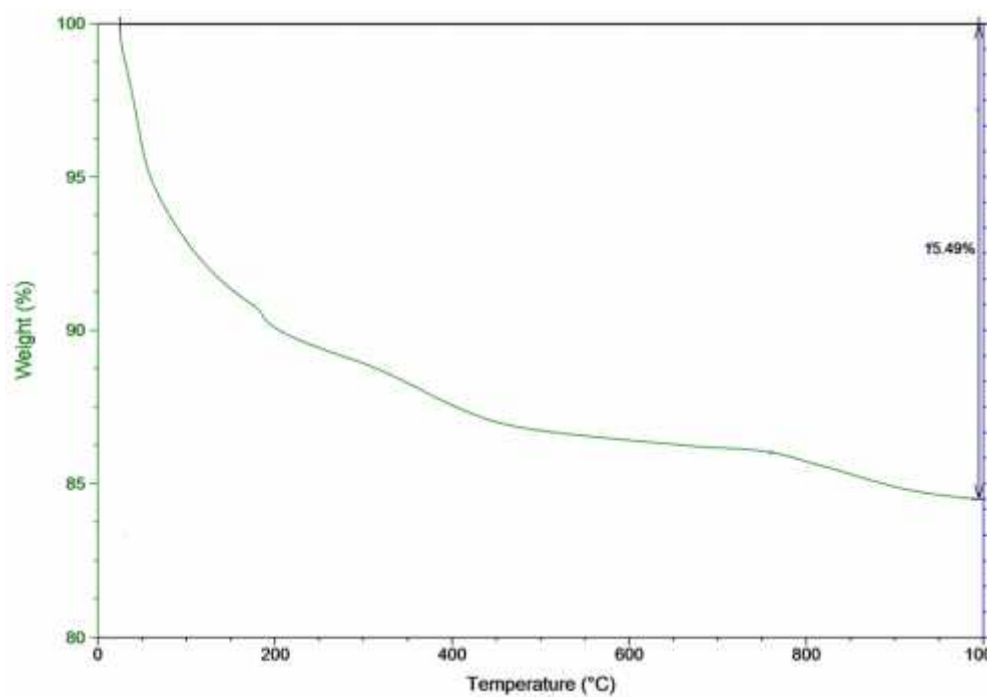


Figura 5.3 Curva TG correspondiente al material AP-10%-60 mostrando un 15,5 % de pérdida de masa a 1000°C.

5.2 Análisis químico

En la **Tabla 5.1** se recogen los datos de análisis químicos para los materiales sintetizados y en la **Tabla 5.2** se presentan las fórmulas empíricas correspondientes.

Muestra	% C		%H	
	Exp.	Teórico	Exp.	Teórico
AP-1%-60	0,316	0,32	0,631	0,61
AP-3%-60	0,570	0,57	0,843	0,82
AP-5%-60 *	0,538	–	4,451	–
AP-7%-60	0,712	0,71	1,654	1,65
AP-10%-60	1,262	1,29	1,116	1,2

Tabla 5.1 Porcentajes de carbono e hidrógeno experimental y calculado para las muestras sintetizadas 60°C

Muestra	Fórmula
AP-1%-60	$\text{Ca}_{9,90} (\text{HPO}_4)_{0,03} (\text{PO}_4)_{5,78} [\text{HO}_3\text{P-CH}(\text{OH})\text{-CO}_2]_{0,09} (\text{CO}_3)_{0,1} (\text{OH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
AP-3%-60	$\text{Ca}_{9,85} (\text{HPO}_4)_{0,1} (\text{PO}_4)_{5,6} [\text{HO}_3\text{P-CH}(\text{OH})\text{-CO}_2]_{0,2} (\text{CO}_3)_{0,1} (\text{OH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
AP-5%-60 *	-----
AP-7%-60	$\text{Ca}_{9,81} (\text{PO}_4)_{5,66} [\text{HO}_3\text{P-CH}(\text{OH})\text{-CO}_2]_{0,34} (\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
AP-10%-60	$\text{Ca}_{9,7} (\text{PO}_4)_{5,4} [\text{HO}_3\text{P-CH}(\text{OH})\text{-CO}_2]_{0,6} (\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Tabla 5.2 Fórmulas empíricas derivadas de las muestras sintetizadas *No calculada por exceso de hidratación de la muestra

A partir de los datos de análisis químico se puede afirmar que los materiales sintetizados y secos en estufa a 60°C son todavía de naturaleza química compleja, destacando su no estequiometría con relación a la fórmula del hidroxiapatito de referencia, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Además de ser ligeramente deficientes en calcio, en general contienen gran cantidad de agua y en algunos casos la fórmula requiere la presencia de pequeñas cantidades de hidrogenofosfato y carbonato para mantener la electroneutralidad del compuesto. La presencia de carbonato en hidroxiapatito es bastante frecuente en preparaciones de laboratorio (Markovic et al., 2004). Esta complejidad no es rara en estos materiales, ya que la composición, las propiedades fisicoquímicas, tamaño de cristal y la morfología de los apatitos sintéticos son extremadamente sensibles a las condiciones de preparación (Markovic et al., 2004). Por esta razón y con el objeto de obtener materiales más puros, las muestras secas a 60°C se sometieron a un tratamiento térmico a 150 °C durante 24 h. El resultado de este tratamiento se muestra en la siguiente sección, donde se analizan las muestras por difracción de rayos-X.

5.3 Difracción de Rayos-X

Los diagramas de difracción de rayos-X se muestran en las **Figuras 5.4-5.8**. Asimismo los datos estructurales obtenidos por afinamiento de Rietveld aparecen en la **Tabla 5.3**.

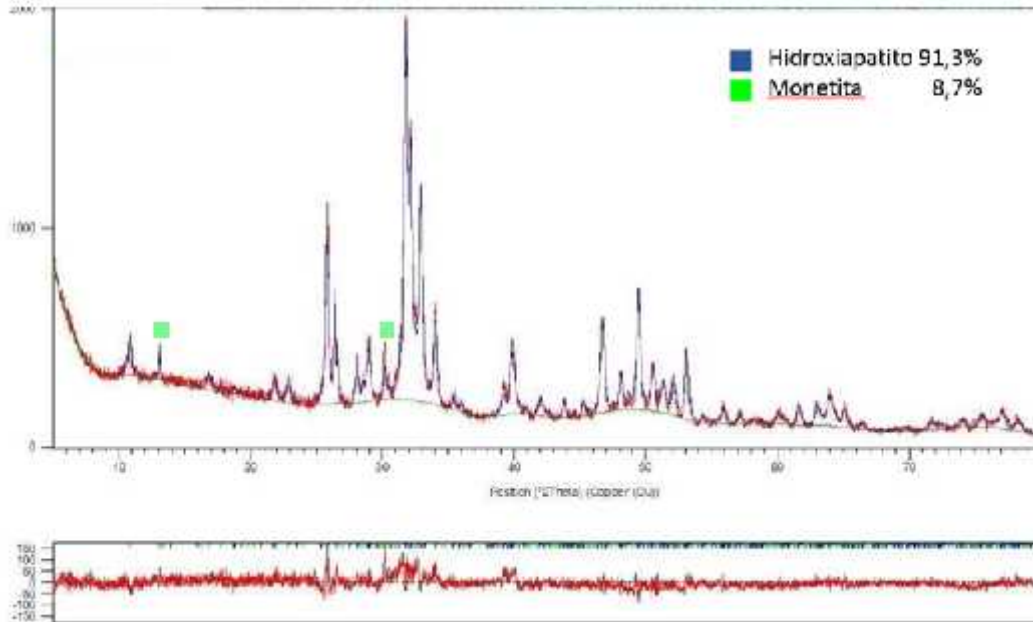


Figura 5.4 Difractogramas de rayos-X experimental (), calculado () y curva diferencia (abajo) obtenidos por afinamiento de Rietveld para la muestra AP-1%-150. Los principales picos de la fase cristalina minoritaria (monetita) aparecen marcados en verde.

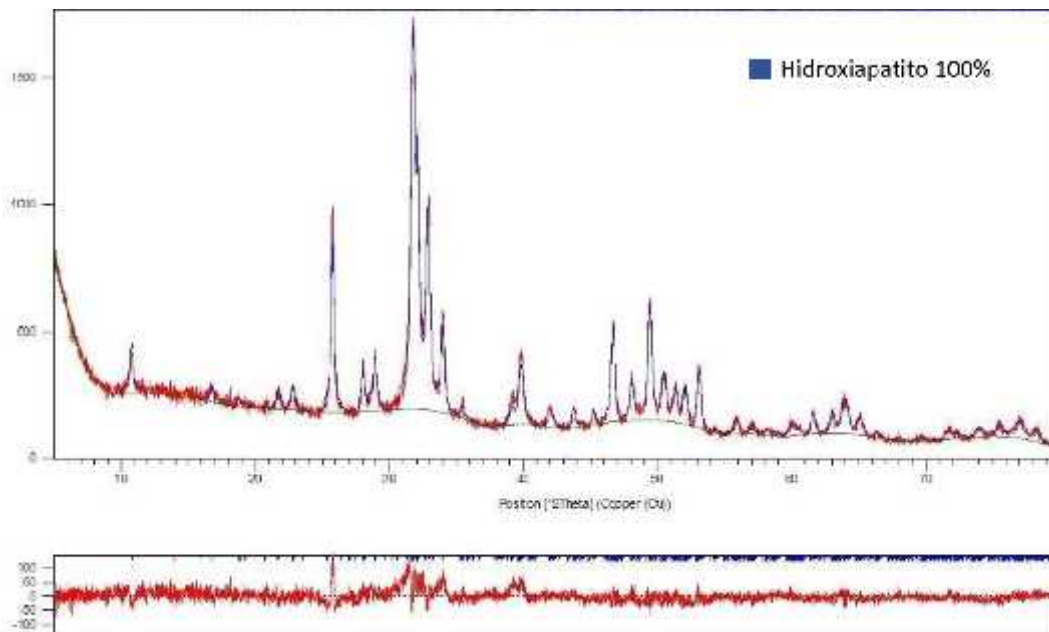


Figura 5.5 Difractogramas de rayos-X experimental (), calculado () y curva diferencia (abajo) obtenidos por afinamiento de Rietveld para la muestra AP-3%-150.

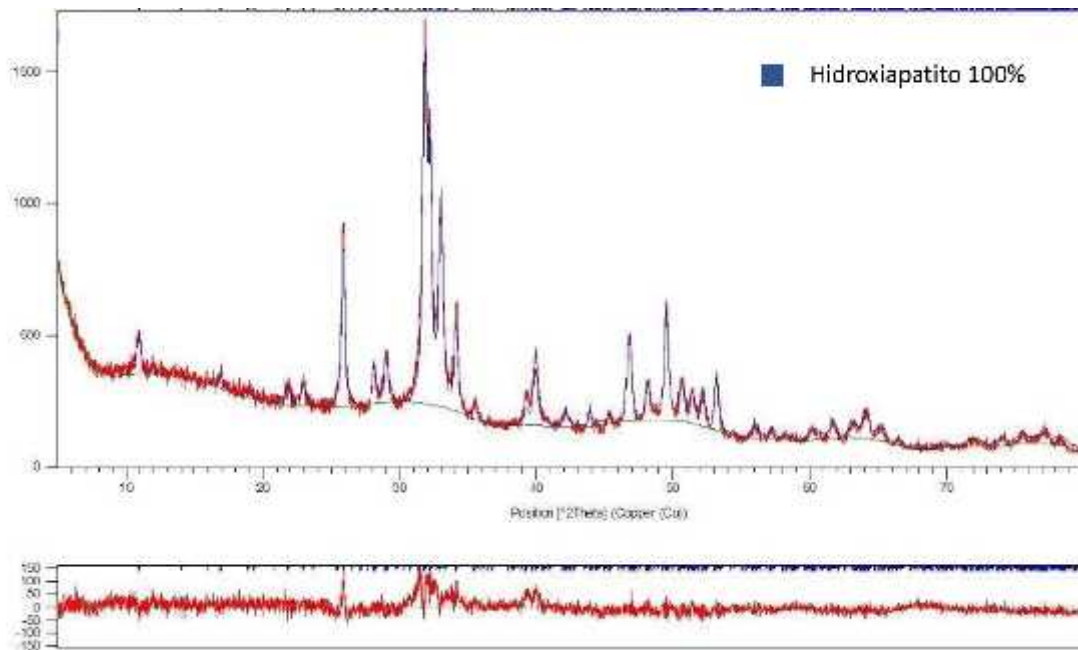


Figura 5.6 Difractogramas de rayos-X experimental (), calculado () y curva diferencia (abajo) obtenidos por afinamiento de Rietveld para la muestra AP-5%-150.

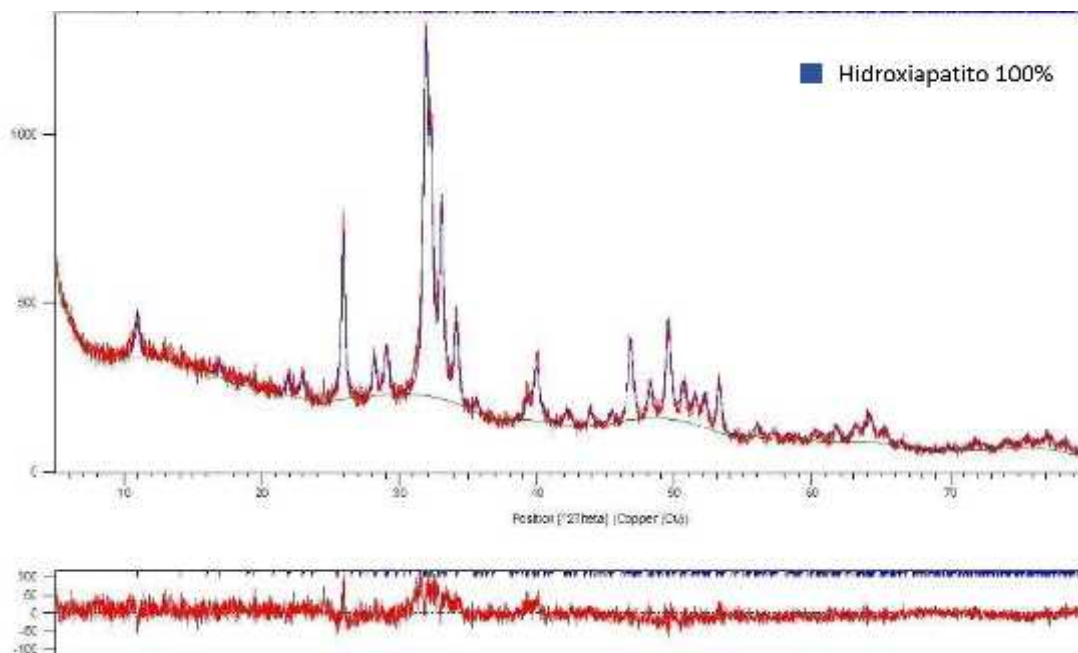


Figura 5.7 Difractogramas de rayos-X experimental (), calculado () y curva diferencia (abajo) obtenidos por afinamiento de Rietveld para la muestra AP-7%-150.

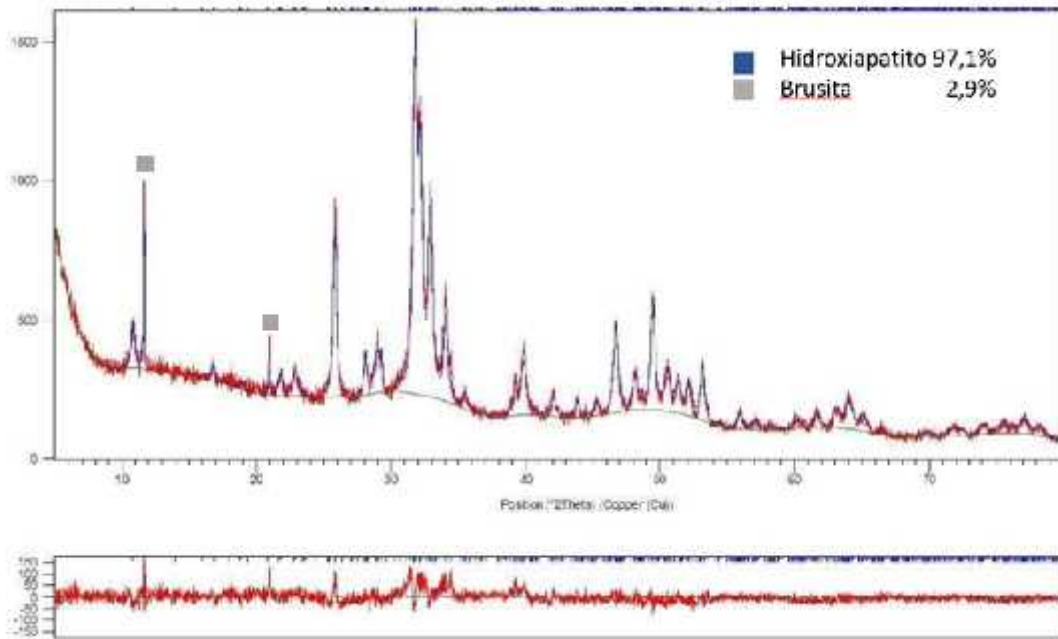


Figura 5.8 Difractogramas de rayos-X experimental (), calculado () y curva diferencia (abajo) obtenidos por afinamiento de Rietveld para la muestra AP-10%-150. Los principales picos de la fase cristalina minoritaria (brusita) aparecen marcados en gris.

Datos cristalográficos de hidroxiapatito	Muestras AP-X%-150				
	X=1	X=3	X=5	X=7	X=10
Grupo espacial	P 1 21/c 1	P 1 21/c 1	P 1 21/c 1	P 1 21/c 1	P 1 21/c 1
a/ Å	9.392	9.388	9.384	9.386	9.389
b/ Å	6.8904	6.8911	6.8927	6.8937	6.8893
c/ Å	18.829	18.834	18.819	18.825	18.827
alpha/ °	90	90	90	90	90
beta/ °	119.81	119.78	119.72	119.71	119.73
gamma/ °	90	90	92	90	90
V/ 10 ⁶ pm ³	1057.38300	1027.47200	1057.06200	1057.97600	1057.46300
Rwp / % *	9.01868	8.92760	9.81971	8.71351	8.51310

Tabla 5.3 Datos cristalográficos seleccionados para la fase de hidroxiapatito en los diversos materiales obtenidos *Rwp: Índice de acuerdo (weighted profile). El afinamiento es correcto si Rwp<10%

Los datos de difracción de rayos-X revelan que todos los materiales son altamente cristalinos con una pequeña fracción amorfa, detectada por las ondulaciones y la intensidad de la señal de fondo en los difractogramas. Entre las fases cristalinas, la de hidroxiapatito es, con gran diferencia, la mayoritaria. Sólo los materiales **AP-1%-150** y **AP-10%-150** contiene una fase cristalina adicional en muy pequeña proporción. El primero contiene monetita (CaHPO_4) en un 8,7% y el segundo brusita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en un 2,9%. Mientras que los materiales de composición intermedia solo contienen hidroxiapatito como fase cristalina. Las fases cristalinas minoritarias,

en todo caso no tienen por qué afectar a la biocompatibilidad del material, ya que son fosfatos de calcio reabsorbibles.

Resaltar que no aparece ninguna señal de la presencia de $\text{Ca}(\text{HPAA})\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ que se usó como reactivo de partida, ni ninguna otra forma cristalina de fosfonato de calcio. Este hecho nos lleva a pensar que el fosfonato se encuentra en la fase amorfa y no forma parte de la estructura de hidroxiapatito, como, por otra parte sería de esperar, dado el gran tamaño del ligando fosfonato. Es de destacar que la forma del hidroxiapatito obtenido es monoclinica en lugar de la simetría normal hexagonal, que es el modo habitual en que se presenta el hidroxiapatito sintetizado a baja temperatura por vía húmeda. El hidroxiapatito hexagonal tiene el grupo espacial $P6_3/m$; en cambio el obtenido en este trabajo tiene grupo espacial $P12_1/c1$. La síntesis de la forma monoclinica normalmente se produce a temperaturas muy elevadas, aunque es la forma termodinámicamente más estable (Ma and Liu, 2009). Aquí nosotros especulamos que aunque el ligando fosfonato esté en la fracción amorfa del material y no forme parte del cristal de hidroxiapatito puede ejercer una función de control de la cristalización de hidroxiapatito y, por tanto, favorecer la forma monoclinica. Ya que en algunos materiales aparece las fases cristalinas brusita y monetita (forma deshidratado de brusita), se piensa que el ligando fosfonato puede favorecer, en primera instancia, la formación de estas fases que después se hidrolizan a hidroxiapatito monoclinico (Ma and Liu, 2009). Por lo tanto, este es un método de síntesis de hidroxiapatito monoclinico a baja temperatura, que evita la calcinación del material a $T > 800^\circ\text{C}$ y/o aplicación de altas presiones (Suetsugu and Tanaka, 2002). La mayor diferencia entre el hidroxiapatito monoclinico y el hexagonal es la orientación de los grupos hidroxilos en la estructura. En el monoclinico, todos los OH^- de una misma columna apuntan en la misma dirección, mientras que en la columna adyacente la dirección se invierte. Por otra parte, en la estructura hexagonal, los OH^- adyacentes apuntan en direcciones opuestas (Figura 5.9).

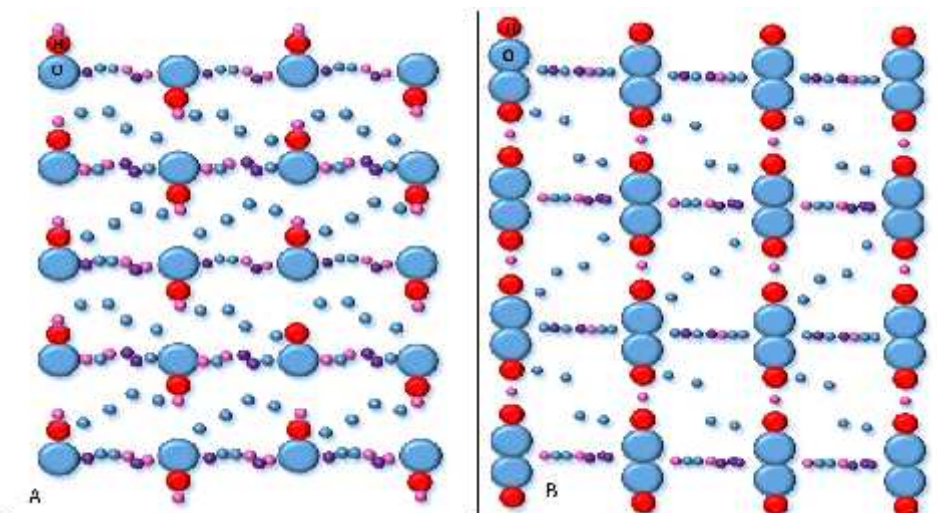


Figura 5.9 Dibujos esquemáticos de la estructura atómica del hidroxiapatito monoclinico (A) comparado con el hidroxiapatito hexagonal (B). En rojo se representa el hidrógeno y en azul (grande) el oxígeno de los grupos OH^- .

5.4 Morfología y superficie específica

En la **Figura 5.10** aparece un mosaico de imágenes SEM de las muestras preparadas a 150°C a diferente resolución. En general, los materiales están formados por partículas o cristales de naturaleza submicrométrica (tamaño inferior a la micra) junto con maclas de mayor tamaño y morfología bien definida. Por tanto, podemos concluir que la diferente proporción de fosfonato afecta a la morfología del material.

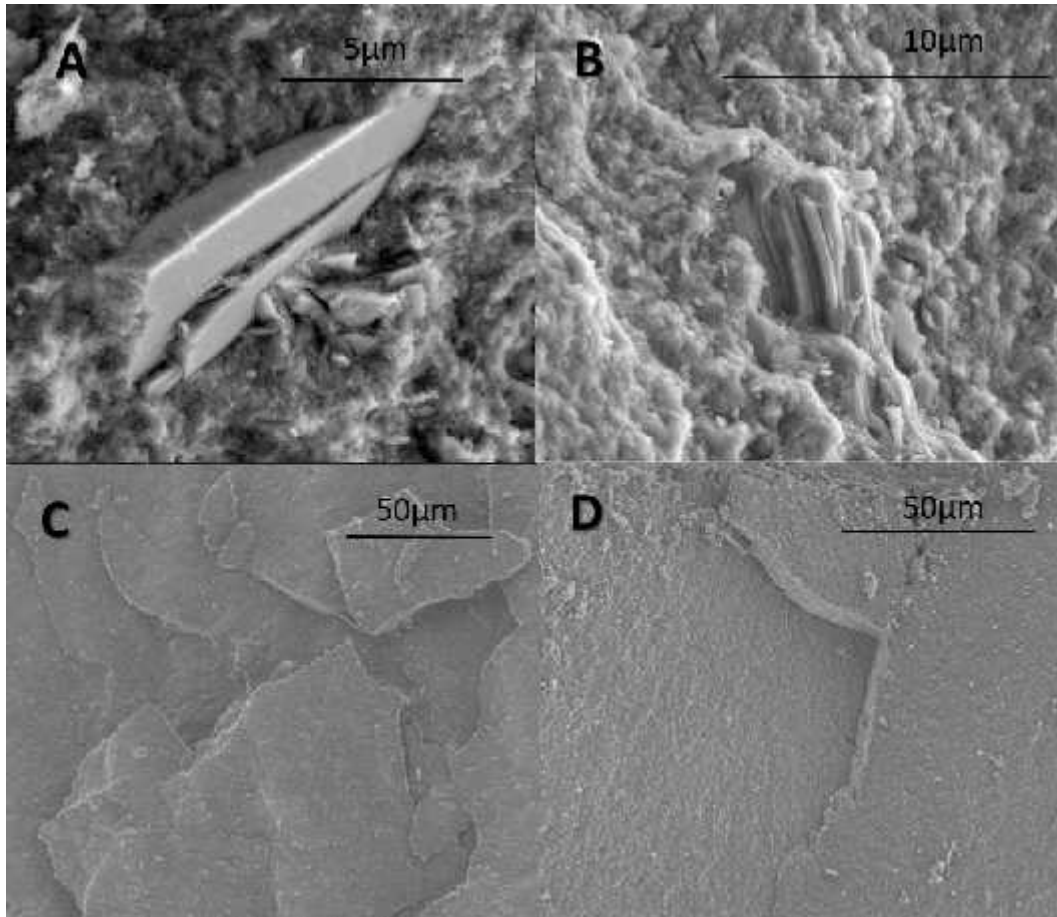


Figura 5.10 Mosaico de imágenes SEM de la morfología general de muestras tratadas en diferentes condiciones experimentales. A) Muestra AP-1%-150; B) Muestra AP-3%-150; C) Muestra AP-5%-150; D) Muestra AP-7%-150.

El efecto del tratamiento térmico se muestra **Figura 5.11**. Se observa la formación de partículas esféricas de tamaño menor de 1 μm cuando la muestra se calcina a 900°C con ausencia total de maclas a diferencia de lo observado con el tratamiento a 150°C, en el que las partículas son de menor tamaño pero en algunos casos asociadas en maclas que pueden tener hasta 50 μm de tamaño.

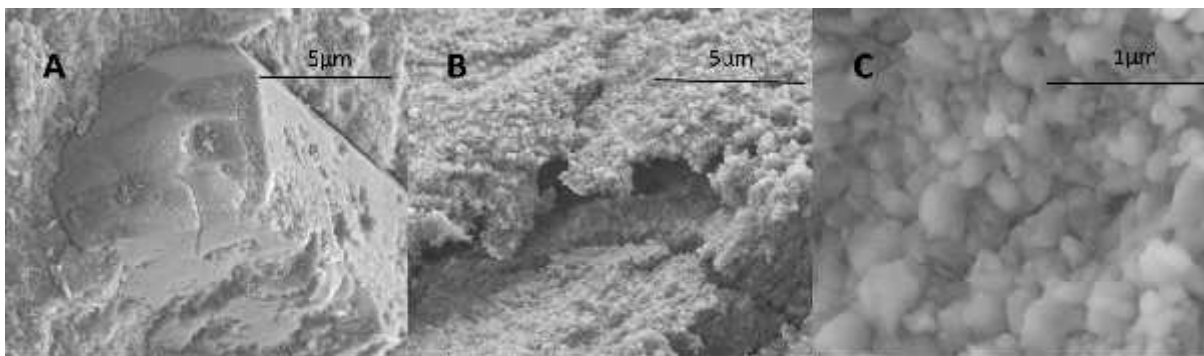


Figura 5.11 Mosaico de imágenes SEM de la morfología de muestras obtenidas en diferentes condiciones experimentales. A) Muestra AP-10%-150; B) y C) Muestra Ap-10%-900.

En la **Figura 5.11** podemos ver el efecto del tratamiento térmico, al igual que en la **Figura 5.12**, en las muestras con un 10% de fosfonato. Las muestras tratadas a menor temperatura muestran formaciones de maclas de un tamaño considerable, no siendo así en la muestra tratada a 900°C.

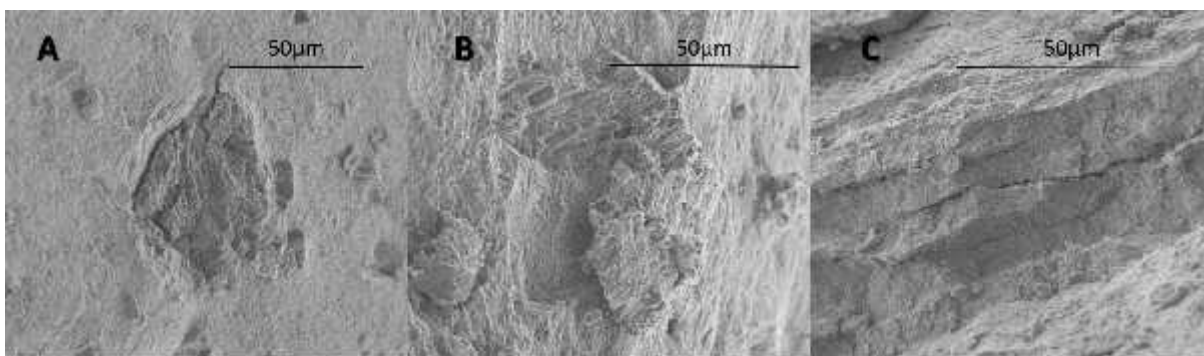
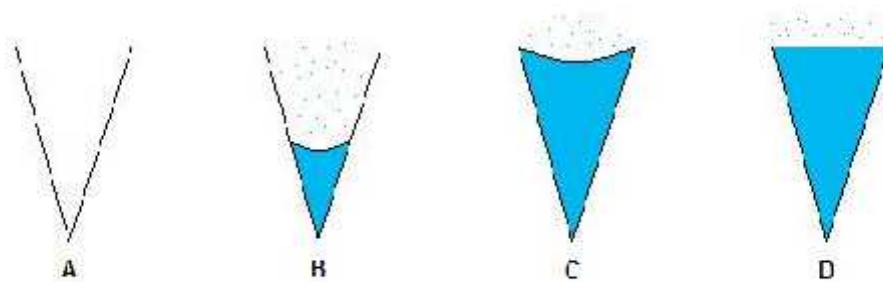


Figura 5.12 Mosaico de imágenes SEM de la morfología de las muestras con 10% de fosfonato tratadas a diferentes temperaturas. A) Muestra AP-10%-60; B) Muestra AP-10%-150; C) Muestra AP-10%-900.

En las **Figuras 5.14 y 5.15** se muestran las isotermas de adsorción-desorción de N_2 a 77K para los materiales **AP-1%-900** y **AP-10%-900**. El fundamento de una isoterma de adsorción-desorción de un gas sobre una superficie sólida se basa en que el gas se adsorbe en la superficie en función de su presión parcial. La medida de la cantidad adsorbida en un intervalo completo de presiones parciales, a una cierta temperatura, al ser representada en una gráfica constituye dicha isoterma. Estas isotermas pueden tener diferentes formas dependiendo del tipo de adsorbente, el tipo de adsorbato y las interacciones intermoleculares entre el gas y la superficie.

Estas isotermas pueden considerarse como una combinación de las de tipo II y IV según la clasificación de la IUPAC (International Union Pure Applied Chemistry) (**Rouquerol et al., 1994**). Mientras que la de tipo II describe una adsorción en los macroporos del material adsorbente con fuertes interacciones adsorbato (N_2)-adsorbente, la de tipo IV caracteriza a adsorbentes mesoporosos con afinidad relativamente fuerte por el adsorbato (a diferencia del tipo V). Las isotermas de N_2 para los adsorbentes mesoporosos muestran una histéresis (no coincidencia de las ramas de adsorción y desorción a igual presión relativa) debido a la condensación capilar (**Esquema 5.1**), mediante la cual los poros se llenan con N_2 líquido,

condensado desde la fase vapor, pero a una presión que es inferior a la presión de vapor de saturación del líquido, formándose un menisco en la interfase líquido-vapor:



Esquema 5.1 ilustración de los fenómenos de condensación capilar en un mesoporo a diferentes presiones: $P_A < P_B < P_C < P_D < P_{sat}$. (P_{sat} = presión de saturación del líquido puro) (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/eb/Porous_medium.png)

En consecuencia, a partir de los datos obtenidos, se deduce que estos materiales exhiben una porosidad mixta, macroporos más una pequeña cantidad de mesoporos, la cual se origina por la agrupación de partículas con diferente morfología y tamaño. La superficie específica (S_{BET} , área de un material por unidad de masa determinada por el método de Brunauer-Emmett-Teller) de los materiales estudiados después de calcinar a 900°C oscila entre 11,2568 y 13,5066 m^2/g . Dichos valores concuerdan bastante bien con el valor medio determinado para el material (no calcinado) de hidroxiapatito de referencia (Markovic et al., 2004), que es 18,3 m^2/g , con cristales cilíndricos de tamaño medio de 0,2 μm , de altura, y 0,1 μm , de diámetro. Al calcinar las partículas sinterizan y aumentan de tamaño, por lo que es de esperar que disminuya la superficie específica ligeramente. El aumento de la superficie específica en la serie es paralelo al incremento del contenido de fosfonato, que a alta temperatura experimenta una combustión térmica con liberación de CO_2 y H_2O , sustancias volátiles que generan poros adicionalmente. Aunque su efecto queda parcialmente mitigado por la sinterización de partículas a más alta temperatura, la liberación de mayor cantidad de sustancias volátiles da lugar a mayor superficie y porosidad.

A partir de los datos de adsorción de N_2 se ha determinado la distribución de tamaños de poro para los materiales seleccionados, aplicando el método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) a los valores de la rama de desorción de la isoterma de N_2 . El análisis de la distribución de poros se muestra en las Figuras 5.16 y 5.17. Según la clasificación de la IUPAC, el intervalo de tamaño de los mesoporos, o poros de tamaño medio, está comprendido entre 2 y 50 nm, siendo los macroporos de mayor tamaño y los microporos de menor tamaño. La distribución de tamaños de poro obtenida por este método revela que los sólidos calcinados a 900°C son, fundamentalmente, macroporosos con una ligera mesoporosidad revelada por la histéresis en la isoterma de N_2 .

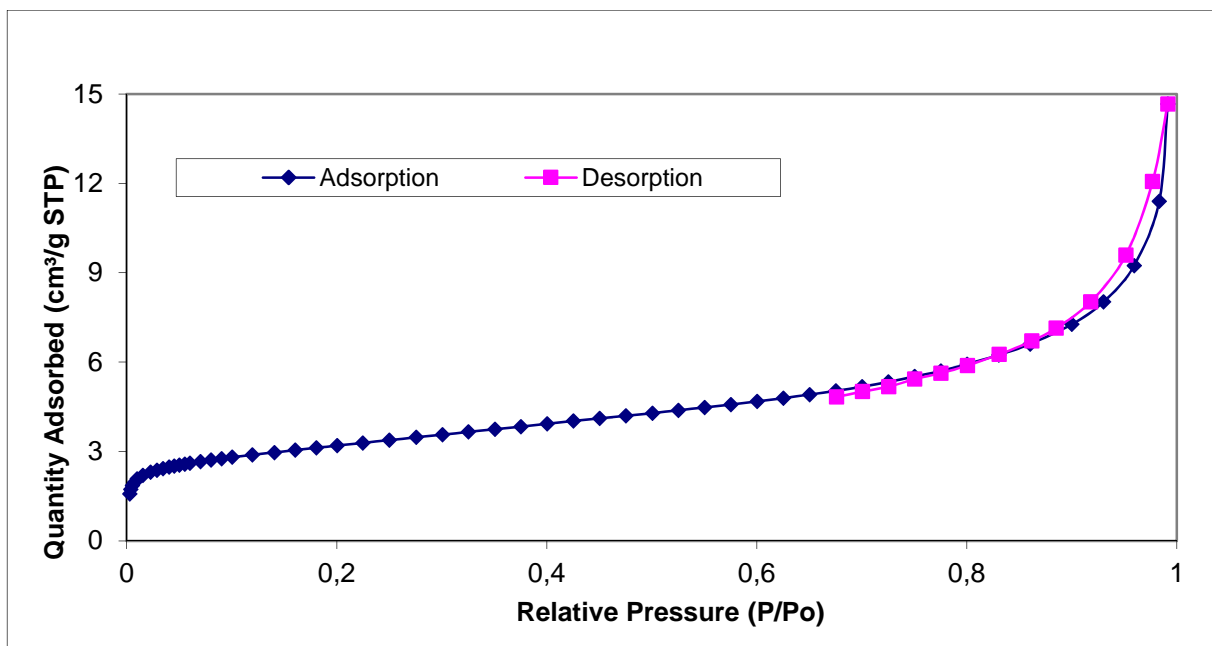


Figura 5.13 Isotherma de adsorción-desorción de N_2 a 77K para la muestra AP-1%-900

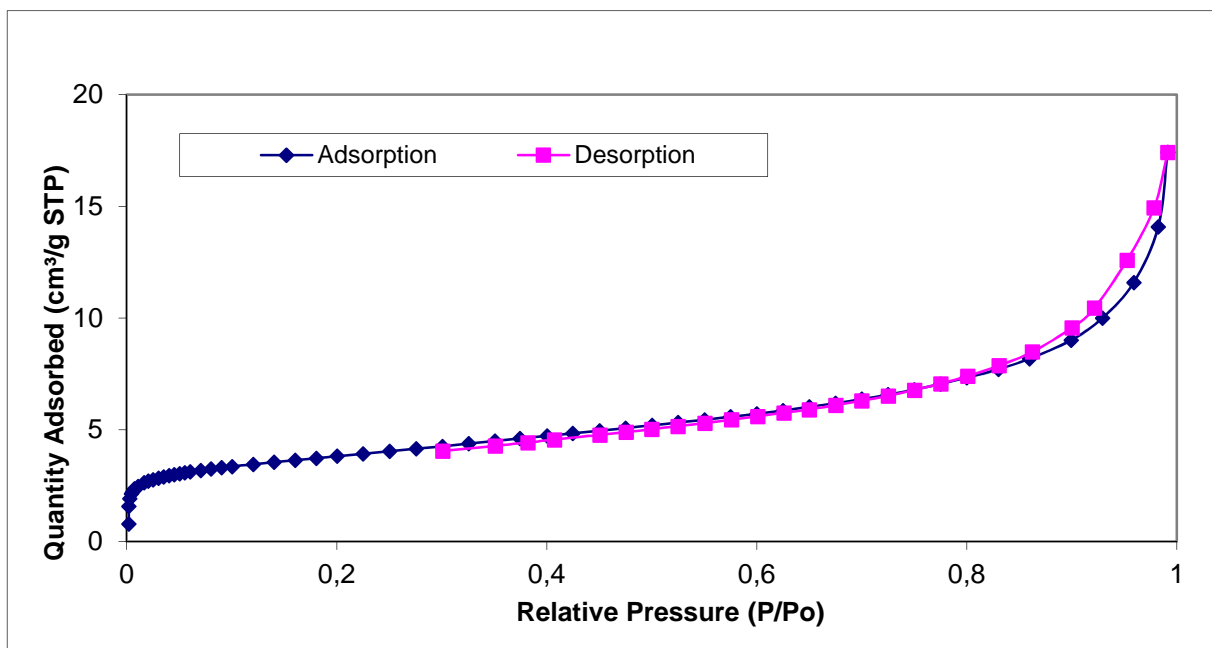


Figura 5.14 Isotherma de Adsorción-Desorción de N_2 a 77K para la muestra AP-10%-900

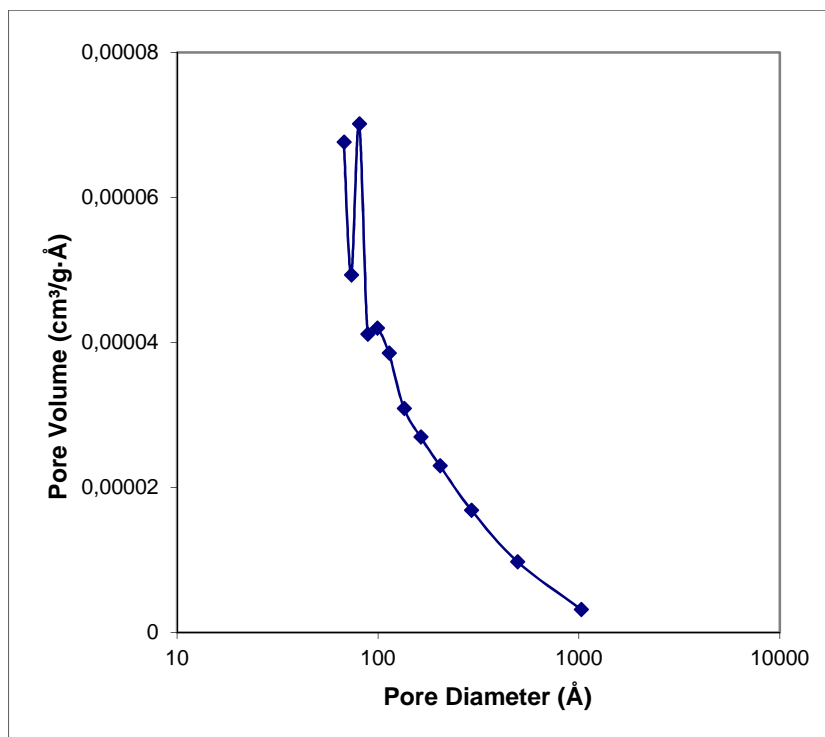


Figura 5.15 Distribución del tamaño de poro según el método BJH (Desorción) para la muestra AP-1%-900.

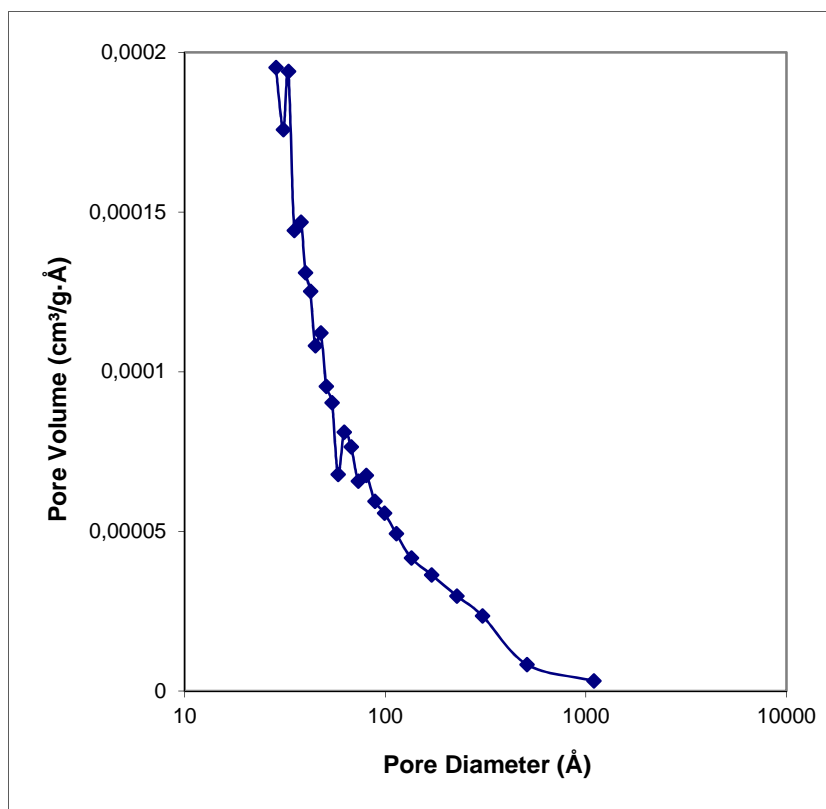


Figura 5.16 Distribución del tamaño de poro según el método BJH (Desorción) para la muestra AP-10%-900

5.5 Espectroscopía infrarroja

El espectro FTIR de un material representativo de la serie de compuestos sintetizados se muestra en la **Figura 5.18**. En la región de vibración de tensión (3600-3000 cm^{-1}) aparece una banda ancha sin picos definidos sobre 3400 cm^{-1} , que es debida a la vibración de tensión, ν (H–OH) de la molécula de agua. Una vibración de tensión supone un cambio en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las bandas que aparecen a 2500-2200 cm^{-1} son características de grupos hidrogenofosfonatos, tensión P–OH o ν (P–OH), (**Ma et al., 2013**) lo cual indica que el ligando fosfonato no se encuentra totalmente desprotonado. En esa región se encuentran también los sobretonos y combinaciones de los modos ν_3 y ν_1 del grupo PO_4 (**Markovic et al., 2004**). La débil banda sobre 1620 cm^{-1} se debe a la vibración de flexión (deformación) de la molécula de agua, δ (H–OH). Las vibraciones de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces. Como esta banda es ancha puede contener también señales características del grupo C=O del carboxilato del fosfonato, que generalmente se encuentran en la región 1730-1470 cm^{-1} ; mientras que las correspondientes al grupo C–O, ν (C–O), aparecen a más baja frecuencia (**Ayi et al., 2014**). No obstante, las señales son tan débiles que resulta difícil su identificación en el espectro. Ello es debido a que el ligando fosfonato se encuentra bastante diluido en el material y, además, la masa de la muestra (impuestas por las condiciones experimentales de trabajo del aparato) sujeta al haz IR era muy pequeña. Las vibraciones de tensión del grupo P=O junto con las del grupo –P–O (1200-900 cm^{-1}) tanto del ligando fosfato (PO_4) como del fosfonato (C- PO_3) aparecen superpuestas en una banda intensa asimétrica centrada aproximadamente a 1000 cm^{-1} . En resumen, el espectro FTIR de los materiales contiene bandas características de fosfato y fosfonato y, por tanto, los materiales se pueden considerar globalmente como fosfatos-fosfonatos de calcio.

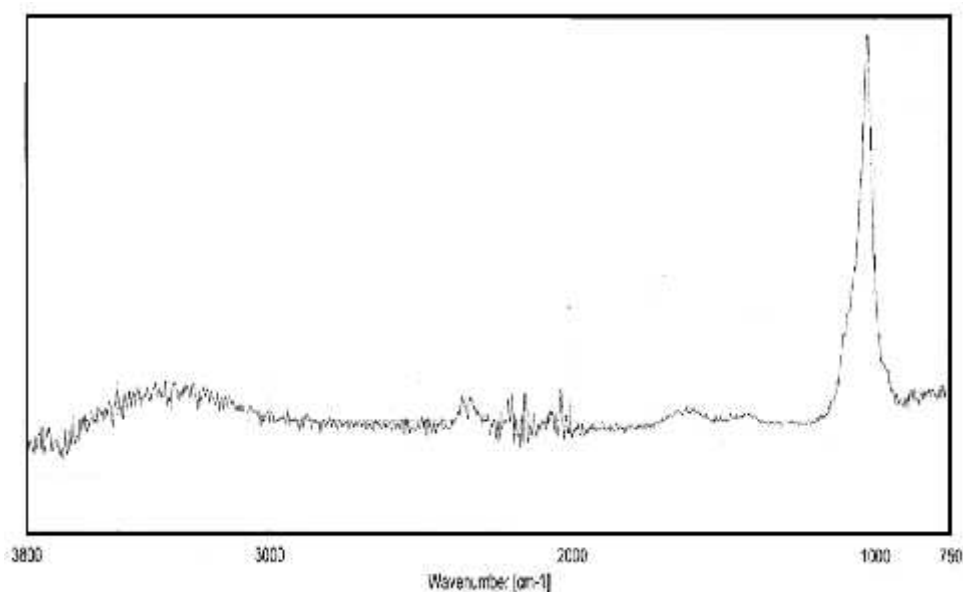


Figura 5.17 Espectro infrarrojo para la muestra AP-10%-60

5.6 Estudio de biocompatibilidad

El estudio de biocompatibilidad se muestra en las **Figuras 5.19 y 5.20**. En primer lugar cabe destacar la presencia de los materiales de hidroxiapatito no modifica el medio de cultivo celular, ya que no se aprecian cambios en la coloración del mismo ni diferencias con respecto al hidroxiapatito de control (C). Cuando los sólidos modifican el ambiente celular se aprecia un cambio de color inmediato del rosa al amarillo, lo cual no se ha observado para ninguna de las muestras estudiadas (**Figura 5.19**).

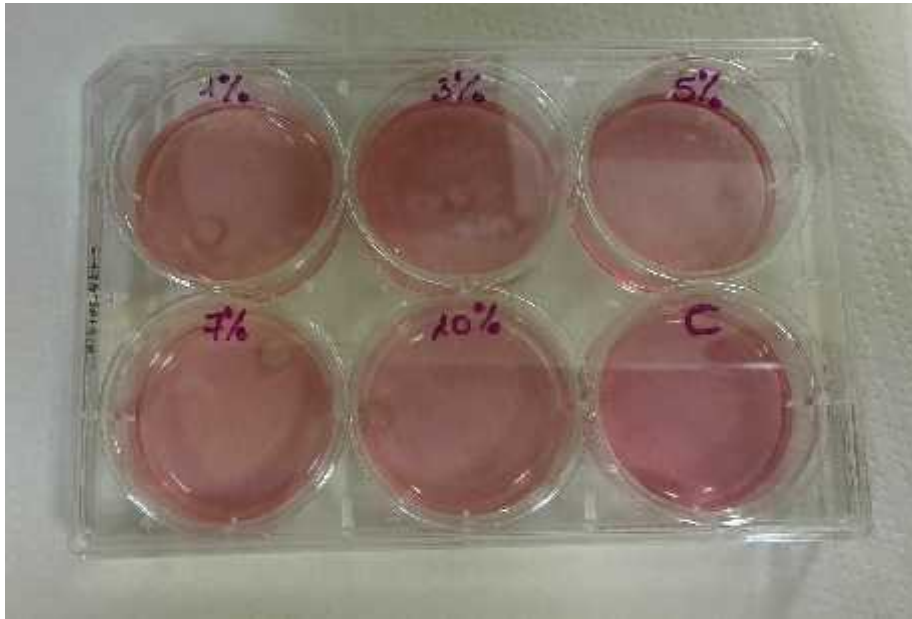


Figura 5.18 Fotografía del medio de cultivo celular utilizado en este trabajo. Por comparación se muestra también el correspondiente a una muestra de control de hidroxiapatito.

En la **Figura 5.20** se observan imágenes de la viabilidad celular en presencia de pastillas prensadas y esterilizadas de las muestras estudiadas. De estas imágenes se deduce que la viabilidad está relacionada con el contenido de fosfonato de los materiales. Los mejores resultados para células mesenquimales de rata se dan en las muestras **AP-1%-150** y **AP-3%-150**, con un comportamiento similar al del material de control tanto en número como en proximidad de las células a las pastillas. Las muestras de mayor contenido en fosfonato, **AP-7%-150** y **AP-10%-150** revelan una caída de la biocompatibilidad debido a la disminución de células vivas en torno a la pastilla del material. La muestra **AP-5%-150** tiene un comportamiento intermedio.

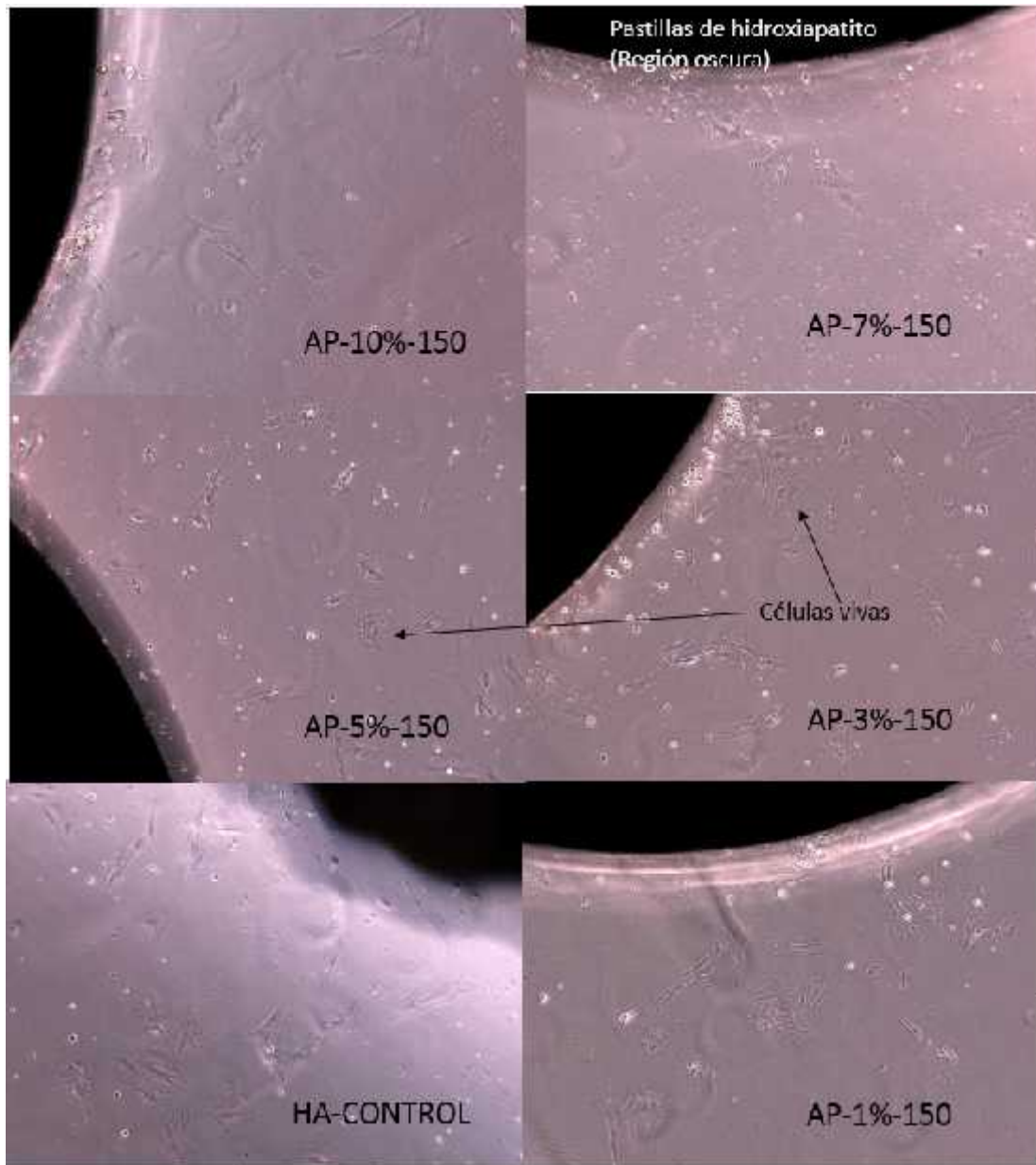


Figura 5.19 Mosaico de imágenes de viabilidad celular a 10 aumentos de células mesenquimales de rata en presencia de pastillas prensadas y esterilizadas de hidroxiapatito. Las regiones oscuras representan las pastillas de las muestras preparadas. La biocompatibilidad se compara con una muestra de control (HA-CONTROL).

En consecuencia, los hidroxiapatitos sintetizados con un contenido en fosfonato del 5% o inferior muestran una biocompatibilidad similar a un material de hidroxiapatito de referencia, utilizado en estudios de viabilidad celular. Por lo cual estas composiciones podrían ser utilizadas en procesos de recubrimiento de metales para implantes óseos. Los resultados, no obstante, deben ser considerados todavía como preliminares y son necesarios más estudios en profundidad con el objeto de determinar su biocompatibilidad como biomateriales.

6. Conclusiones

1. Se han sintetizado, en dos etapas, una serie de materiales de hidroxiapatito con un alto grado de pureza, conteniendo cantidades variables [1-10%] de fósforo en forma de fosfonato. La primera etapa es una reacción hidrotermal y la segunda es un tratamiento térmico de los sólidos a 150°C.
2. Los materiales constan de una fase cristalina mayoritaria de hidroxiapatito (>91%) y una fase amorfa minoritaria no cuantificada.
3. La fase cristalina de hidroxiapatito, con un grado de pureza de 91-100% tiene una estructura monoclinica que la diferencia de la estructura hexagonal normalmente obtenida en condiciones similares. Dado que esta fase monoclinica es termodinámicamente más estable, ello puede reportar un beneficio añadido para el uso como biomaterial; puesto que ésta es la estructura que posiblemente pueda existir en los tejidos duros.
4. La estructura morfológica y la superficie específica se ve modificada por la presencia variable de fosfonato, de tal manera que las muestras con mayor contenido en fosfonato son las que presentan mayor porosidad.
5. El estudio preliminar de biocompatibilidad revela que los hidroxiapatitos con un contenido en fosfonato no superior al 5% muestran un comportamiento con respecto a la viabilidad celular similar al de una muestra de referencia de hidroxiapatito.

Futuras líneas de trabajo

- Completar los estudios de biocompatibilidad.
- Realizar estudios de propiedades mecánicas.
- Estudiar las propiedades de estos materiales como recubrimiento para implantes metálicos.
- Estudiar la viabilidad de los materiales como "Scaffolds" en ingeniería tisular a partir de sólidos preparados con porosidad controlada.
- Determinar los límites de tolerancia de fosfonato en los materiales biocompatibles de hidroxiapatito.

7. Bibliografía

Aced Jiménez, E., Ruiz de León, G., Hernández-Pacheco, E., Torres-Lagares, D., and Gutiérrez-Pérez, J.L. (2013). Actualización en microimplantes de relleno perioral atendiendo a su permanencia. *Revista Española de Cirugía Oral Y Maxilofacial* 35, 59–68.

Aoki, H. (1991). Science and medical applications of hydroxyapatite (Ishiyaku Euroamerica).

Ayi, A.A., Kinnibrugh, T.L., and Clearfield, A. (2014). Hydrothermal synthesis and structural characterization of ammonium ion-templated lanthanide(III) carboxylate-phosphonates. *Frontiers in Chemistry* 2.

Bazaga-Garcia, M., Cabeza, A., Olivera-Pastor, P., Santacruz, I., Colodrero, R.M.P., and Aranda, M.A.G. (2012). Photodegradation of Phenol over a Hybrid Organo-Inorganic Material: Iron(II) Hydroxyphosphonoacetate. *The Journal of Physical Chemistry C* 116, 14526–14533.

Best, S. (2012). Mineral coatings for orthopaedic applications. *Coatings for Biomedical Applications* 43.

Boanini, E., Gazzano, M., and Bigi, A. (2010). Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomaterialia* 6, 1882–1894.

Bose, K.S., and Sarma, R.H. (1975). Delineation of the intimate details of the backbone conformation of pyridine nucleotide coenzymes in aqueous solution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 1173–1179.

Boskey, A.L. (2015). Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *BoneKEY Reports* 4, 710.

Brunauer, S., Emmett, P.H., and Teller, E. (1938). Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society* 60, 309–319.

Colodrero, R.M.P., Cabeza, A., Olivera-Pastor, P., Papadaki, M., Rius, J., Choquesillo-Lazarte, D., García-Ruiz, J.M., Demadis, K.D., and Aranda, M.A.G. (2011). Common Structural Features in Calcium Hydroxyphosphonoacetates. A High-Throughput Screening. *Crystal Growth & Design* 11, 1713–1722.

De Jong WF. La substance minerale dans les os. *Recl Trav Chim Pays – Bas Belg.* 1926;45:445–448

Elliott, J.C. (1997). Structure, crystal chemistry and density of enamel apatites. *Ciba Found. Symp.* 205, 54–67; discussion 67–72.

Epinette, J.A., and Manley, M.T. (2004). Fifteen years of clinical experience with hydroxyapatite coatings in joint arthroplasty.

Faig-Martí, J., and Gil-Mur, F. (2008). Los recubrimientos de hidroxiapatita en las prótesis articulares. *Revista Española de Cirugía Ortopédica Y Traumatología* 52, 113–120.

Hench, L.L. (1991). Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society* 74, 1487–1510.

Hernandez, A.G. (DRT) (2010). Tratado de Nutrición: Bases Fisiológicas y bioquímicas de la nutrición (Ed. Médica Panamericana). Pag 911.

Kay, M.I., Young, R.A., and Posner, A.S. (1964). Crystal Structure of Hydroxyapatite. *Nature* 204, 1050–1052.

Kumar, P., Fathima, G., and Vinitha, B. (2013). Bone grafts in dentistry. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 5, 125.

Laurencin, C., Khan, Y., and El-Amin, S.F. (2006). Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices* 3, 49–57.

Ma, G., and Liu, X.Y. (2009). Hydroxyapatite: Hexagonal or Monoclinic? *Crystal Growth & Design* 9, 2991–2994.

Ma, K.-R., Wei, C.-L., Zhang, Y., Kan, Y.-H., Cong, M.-H., and Yang, X.-J. (2013). Structures and Spectroscopy Studies of Two M(II)-Phosphonate Coordination Polymers Based on Alkaline Earth Metals (M = Ba, Mg). *Journal of Spectroscopy* 2013, 1–9.

Markovic, G., Dizdar, D., Jukic, I., and Cardinale, M. (2004). Reliability and factorial validity of squat and countermovement jump tests. *The Journal of Strength & Conditioning Research* 18, 551–555.

Matsumine, A., Myoui, A., Kusuzaki, K., Araki, N., Seto, M., Yoshikawa, H., and Uchida, A. (2004). Calcium hydroxyapatite ceramic implants in bone tumour surgery. A long-term follow-up study. *J Bone Joint Surg Br* 86, 719–725.

Mcdowell, H., Gregory, T.M., and Brown, W.E. (1977). Solubility of $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ in the system $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ at 5-degrees-C, 15-degrees-C, 25-degrees-C and 37-degrees-C (National Bureau of Standards).

Metsger, D.S., Rieger, M.R., and Foreman, D.W. (1999). Mechanical properties of sintered hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramic. *J Mater Sci Mater Med* 10, 9–17.

Orlovskii, V.P., Komlev, V.S., and Barinov, S.M. (2002). Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics. *Inorganic Materials* 38, 973–984.

Posner, A.S., and Betts, F. (1975). Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure. *Accounts of Chemical Research* 8, 273–281.

Rodan, G.A., and Fleisch, H.A. (1996). Bisphosphonates: mechanisms of action. *Journal of Clinical Investigation* 97, 2692–2696.

Ross, M.H., and Pawlina, W. (2007). *Histología* (Ed. Médica Panamericana). Pag 202-203.

Rouquerol, J., Avnir, D., Fairbridge, C.W., Everett, D.H., Haynes, J.M., Pernicone, N., Ramsay, J.D.F., Sing, K.S.W., and Unger, K.K. (1994). Recommendations for the characterization of porous solids (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 66.

Simmer, J.P., and Fincham, A.G. (1995). Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 6, 84–108.

Simon, R., Gomez Ruiz, J.A., von Holst, C., Wenzl, T., and Anklam, E. (2008). Results of a European inter-laboratory comparison study on the determination of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in edible vegetable oils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 1397–1408.

Suetsugu, Y., and Tanaka, J. (2002). Crystal growth and structure analysis of twin-free monoclinic hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 13, 767–772.

Voet, D., and Voet, J.G. (2006). *Bioquímica* (Ed. Médica Panamericana). Pag 164.

Welsch, U., and Sobotta, J. (2008). *Histología* (Ed. Médica Panamericana). Pag 131, 344, 345 y 346.

Wojciech Suchanek, M.Y. (1997). Processing and Properties of Hydroxyapatite-Based Biomaterials for Use as Hard Tissue Replacement Implant. *Journal of Materials Research* 13, 94–117.

Yoshikawa, H., Tamai, N., Murase, T., and Myoui, A. (2009). Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *J R Soc Interface* 6, S341–S348.

Atlas de Histología Vegetal y Animal Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo

Páginas web:

<http://www.chemtube3d.com/solidstate/SShydroxyapatite.htm>

<https://depts.washington.edu/bonebio/ASBMRed/structure.html>

<http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/bones/structure.php>

<http://gower.mse.ufl.edu/research.html#calbone>

<http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/bones/structure.php>

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/eb/Porous_medium.png

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado gracias a la ayuda de muchas personas que han dedicado sus recursos y sobre todo su tiempo a la elaboración de imágenes, datos, experimentos e ideas.

En primer lugar agradecer al Servicio Central de Apoyo a la Investigación su eficacia a pesar de las dificultades técnicas que sufren día sí y día también. Agradecer su dedicación y paciencia a Juan Félix López Tellez, técnico especialista en Microscopía Electrónica de Bionand, por realizar unas fotos maravillosas que, a pesar de que no se encuentren todas en la memoria, no quedarán olvidadas. Dar las gracias también al Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, especialmente a J. A. Andrades y Silvia Claros Gil por su predisposición a ayudarnos y por sus células que tanto nos han servido.

Por supuesto nunca agradeceré como se merece a Pascual por sus recomendaciones, correcciones, artículos, ideas y por una incontable cantidad de horas que han hecho que de este trabajo una realidad.

Por último agradecer a mis amigos y familiares, los presentes y los ausentes, por aguantarme y escucharme a pesar de no entender nada de lo que decía.