



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
Y METALURGIA**

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE
LA BIOACTIVIDAD DE BIOMATERIALES
COMPUESTOS DE HIDROXIAPATITA
CARBONATADA/HIDROXIAPATITA
ESTEQUIOMÉTRICA DE ALTA
CRISTALINIDAD**

Tesis

Que para obtener el título de:

INGENIERO QUÍMICO

Presenta

Fabiola Rivera Landavazo

Hermosillo, Sonora

Marzo 11 de 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a mi madre por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi vida por ser un ejemplo de fortaleza y valentía.

Le doy gracias a mi padre y a mis tíos Norma y Andrés por apoyarme en cada momento durante el transcurso de mi carrera.

A mi director de tesis, Dr. Martin Antonio Encinas Romero por su paciencia y dedicación. Gracias por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi tesis profesional, por todas las facilidades otorgadas y su gran apoyo.

A mis amigos por acompañarme en esta hermosa experiencia, creer en mí, por todas esas horas de estudio y vivencias que nunca olvidare.

Agradezco a mi querida Universidad y al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia por formarme como profesionista y haber compartido sus conocimientos.

DEDICATORIA

*A las dos grandes mujeres de mi vida,
Mi madre y mi abuela.*

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABLAS	viii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. Justificación.....	2
1.2. Objetivos.....	3
1.3. Objetivo General.....	4
1.4. Objetivos Particulares.....	3
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. ¿Qué es un Material?.....	6
2.2. Biomateriales.....	6
2.3. Clasificación de los Biomateriales.....	7
2.3.1. Biomateriales metálicos.....	7
2.3.2. Biomateriales poliméricos.....	7
2.3.3. Biomateriales cerámicos.....	8
2.3.4. Biomateriales bioinertes.....	8
2.3.5. Biomateriales bioactivos.....	8
2.3.6. Biomateriales biorreabsorbibles.....	9
2.3.7. Biomateriales compuestos o compósitos.....	9
2.4. Biocerámicos de Fosfato de Calcio.....	9
2.4.1. Propiedades fisicoquímicas.....	9
2.5. Biocompatibilidad de los Biocerámicos de Fosfatos de Calcio.....	13
2.6. Bioactividad de los Biocerámicos de Fosfatos de Calcio.....	13
2.7. Hidroxiapatita.....	14
2.8. Proceso Sol-Gel.....	14
2.8.1. Ruta Sol Gel Alternativa.....	15
2.8.2. Etapas fundamentales.....	15
2.9. Fluido Fisiológico Simulado.....	17

III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	19
3.1. Materiales y Equipo.....	20
3.2. Metodología Experimental.....	20
3.2.1. Método 1: Síntesis de hidroxiapatita carbonatada.....	20
3.2.2. Método 2: Síntesis de hidroxiapatita estequiométrica.....	22
3.3. Formulación de los Biomateriales Compuestos de Hidroxiapatita Carbonatada/Hidroxiapatita Estequiométrica.....	24
3.4. Técnicas de Caracterización de los Biomateriales Compuestos de Hidroxiapatita.....	24
3.5. Evaluación de las Propiedades Bioactivas.....	26
3.5.1. Preparación del baño fisiológico simulado (SBF).....	26
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1. Síntesis de Hidroxiapatita Estequiométrica de Alta Cristalinidad.....	29
4.1.1. Análisis térmico (ATG/ATD).....	29
4.1.2. Difracción de rayos-X.....	29
4.1.3. Espectroscopia infrarroja de transformadas de Fourier.....	31
4.1.4. Microscopia Electrónica de Barrido.....	31
4.2. Síntesis de Hidroxiapatita Carbonatada.....	32
4.2.1. Análisis térmico (ATG/ATD).....	32
4.2.2. Difracción de rayos-X.....	34
4.2.3. Espectroscopia infrarroja de transformadas de Fourier.....	36
4.2.4. Microscopia Electrónica de Barrido.....	37
4.3. Evaluación de las Propiedades Bioactivas de los Biocerámicos Compuestos de Hidroxiapatita Carbonatada/Hidroxiapatita Estequiométrica de Alta Cristalinidad.....	38
4.3.1. Evaluación de la solubilidad.....	38
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
5.1. Conclusiones.....	45
5.2. Recomendaciones.....	46
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Isotermas de solubilidad para diferentes compuestos de fosfato de calcio a 37°C. La solubilidad esta expresada por la cantidad de iones de calcio en solución en función del pH.....	12
Figura 2. Diagrama de flujo para la síntesis de hidroxiapatita estequiométrica por el método sol-gel.....	20
Figura 3. Diagrama de flujo para la síntesis de hidroxiapatita carbonatada por el método sol-gel.....	22
Figura 4. Curvas de análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA) del xerogel seco producido a partir de fosfato de amonio y nitrato de calcio en agua.....	29
Figura 5. Patrones de difracción de rayos-X del xerogel seco producido a partir de fosfato de amonio y nitrato de calcio en agua, tratado térmicamente a 350°C y 750°C.....	29
Figura 6. Espectro FT-IR del xerogel seco producido a partir de fosfato de amonio y nitrato de calcio en agua tratado térmicamente hasta 750°C.....	31
Figura 7. Micrografía de SEM de la hidroxiapatita estequiométrica producida a partir de fosfato de amonio y nitrato de calcio en agua tratado térmicamente hasta 750°C.....	32
Figura 8. Curvas de análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA) del xerogel seco producido a partir de acetato de calcio y trietil fosfato en agua.....	32

Figura 9. Patrones de difracción de rayos-X del xerogel seco producido a partir de acetato de calcio y trietil fosfato en agua tratado térmicamente hasta 1000°C.....	34
Figura 10. Patrones de difracción de rayos-X del xerogel seco producido a partir de acetato de calcio y trietil fosfato en agua tratado térmicamente hasta 1000°C, lavado con HCL 0.01 M y agua destilada.....	35
Figura 11. Espectro FT-IR del xerogel seco producido a partir de acetato de calcio y trietil fosfato en agua, tratado térmicamente a 1000°C lavado con HCl 0.01 M y agua destilada.....	36
Figura 12. Micrografía de SEM de la hidroxiapatita carbonatada producida a partir de acetato de calcio y trietil fosfato en agua tratada térmicamente hasta 1000°C y lavada con HCl 0.01M y agua.....	37
Figura 13. Curvas de pH y solubilidad de los iones Ca y P para 0.5 gramos De hidroxiapatita estequiometria de alta cristalinidad sumergidos durante 3semanas en la solución SBF.....	38
Figura 14. Curvas de pH y solubilidad de los iones Ca y P para 0.5 gramos De hidroxiapatita carbonatada sumergidos durante 3 semanas en la solución SBF.....	39
Figura 15. Curvas de pH y solubilidad de los iones Ca y P para 0.5 gramos del compósito formulado con 20% hidroxiapatita carbonatada/ 80% hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad sumergidos durante 3 semanas en la solución SBF.	40

Figura 16. Curvas de pH y solubilidad de los iones Ca y P para 0.5 gramos del compósito formulado con 50% hidroxiapatita carbonatada/ 50% hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad sumergidos durante 3 semanas en la solución SBF.41

Figura 17. Curvas de pH y solubilidad de los iones Ca y P para 0.5 gramos del compósito formulado con 80% hidroxiapatita carbonatada/ 20% hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad sumergidos durante 3 semanas en la solución SBF.42

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla I. Características de algunos biomateriales según su clasificación.....	11
Tabla II. Concentración iónica del fluido fisiológico simulado (SBF) propuesto por Kokubo, comparada con el plasma sanguíneo humano.....	17

RESUMEN

La hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, es un biocerámico de fosfato de calcio de gran interés en aplicaciones médicas, lo anterior se deriva de la similitud de este compuesto con la fase mineral del material que componen los tejidos duros del organismo (huesos y dientes). Por lo cual, se han desarrollado varios métodos para su síntesis, donde se destaca el método sol-gel, como una de las rutas más eficientes. En este trabajo se sintetizaron una serie de biocompósitos de hidroxiapatita con diferentes composiciones, mediante dos técnicas sol-gel diferentes agentes precursores de calcio y fósforo. La primera utilizando nitrato de calcio y fosfato de amonio, para producir hidroxiapatita estequiométrica. La segunda utilizando acetato de calcio y trietil fosfato, para producir hidroxiapatita carbonatada. Los biocompósitos fueron caracterizados por análisis térmico diferencial (DTA), análisis termogravimétrico (TGA), difracción de rayos-X (XRD), espectroscopia infrarroja de transformadas de Fourier (FTIR) y microscopia electrónica de barrido (SEM). Los resultados muestran que la hidroxiapatita estequiométrica se forma a una temperatura relativamente baja alrededor de 350°C , en sus primeras etapas de cristalización, mientras que si se trata térmicamente hasta 750°C , se obtiene un producto perfectamente cristalizado. La hidroxiapatita carbonatada se forma aproximadamente a 450°C , acompañada de carbonato de calcio; sin embargo, para purificarla se requirió de un tratamiento térmico hasta 1000°C y lavados repetidos con HCl diluido y agua. Las propiedades bioactivas se analizaron poniendo en contacto estos materiales con una solución de fluido fisiológico simulado (SBF), con la concentración iónica aproximada a la del plasma sanguíneo humano, a 37°C . La bioactividad se evaluó examinando la formación de una capa de apatita neoformada sobre la superficie de los materiales, después de permanecer en contacto durante 1, 2 y 3 semanas con el fluido fisiológico simulado (SBF). Asimismo, se analizó el pH y la carga iónica de la solución SBF remanente, esta última evaluada mediante espectroscopia de absorción atómica y colorimetría. La interacción de estos materiales con el fluido fisiológico simulado produjo una capa de fosfato de calcio sobre sus superficies, con una composición similar a la de las apatitas biológicas. La hidroxiapatita carbonatada, resultó más soluble que la hidroxiapatita estequiométrica perfectamente cristalizada; asimismo, en tanto mayor fue la cantidad de hidroxiapatita estequiométrica perfectamente cristalizada en los biocompósitos, disminuyó en ellos su solubilidad y con ello su bioactividad. Con lo anterior,

queda de manifiesto que se pueden formular biocompósitos de hidroxiapatita, modulando su solubilidad para modificar su bioactividad, con lo cual se podrán proponer biomateriales de hidroxiapatita, como sustitutos de los tejidos duros del organismo, con las características bioactivas semejantes a las de los tejidos que replazarán.

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Justificación

Los biomateriales son sustancias naturales o sintéticas, que son introducidas en el organismo de manera temporal o permanente, como implantes o prótesis, para reparar lesiones en los tejidos del organismo. Actualmente, existen numerosos estudios e investigaciones acerca de nuevas propiedades y posibles aplicaciones de materiales con propiedades biocompatibles, es decir, materiales que pueden funcionar en sistemas biológicos [1].

El tejido óseo está compuesto por tejidos duros y blandos, es el único tejido del organismo, que al ser dañado es capaz de regenerarse por medio de la creación de un tejido exactamente igual al original. De esta manera, cuando el hueso presenta lesiones, ya sea por fracturas u otros defectos, se ponen en marcha de inmediato los mecanismos osteoformadores, con la finalidad de restaurar el tejido óseo en el lugar de la lesión. Generalmente, la dinámica del hueso es suficiente para reconstruir los defectos comunes, sin embargo, en las pérdidas mayores de masa tisular, se hace necesario recurrir al aporte de sustitutos óseos para obtener la reparación.

La hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), es el componente mineral predominante de los huesos de los vertebrados, el esmalte que cubre los dientes y la dentina que los conforma, contienen este mineral. Sus aplicaciones clínicas son de gran relevancia, debido a que es el cerámico de fosfato de calcio químicamente más parecido a los cristales de las apatitas biológicas. Por tal razón se han desarrollado diversas metodologías para su preparación, entre las que destacan métodos de precipitación, hidrotermales, reacciones de estado-sólido, procesos sol-gel, entre otras [2].

El proceso sol-gel es uno de los métodos más importantes para la producción de nuevos materiales. Además de las ventajas comerciales tales como bajos costos de operación, bajo consumo de energía e impacto ambiental casi nulo, el uso de bajas temperaturas en estas técnicas, hace posible tener estricto control de los

parámetros del proceso con mayor flexibilidad, en relación al uso de altas temperaturas en los procesos tradicionales. Entre las ventajas del método sol-gel para la producción de biomateriales inorgánicos se encuentran: nuevas composiciones, mejor control de distribución de tamaños en polvos, altos niveles de pureza, entre otras. Para el caso de la síntesis de fosfatos de calcio, el método sol-gel permite un eficiente mezclado molecular de calcio y fósforo, mejorando la homogeneidad química de los productos. Asimismo, la alta reactividad de los materiales producidos vía sol-gel permite la reducción de temperaturas y evitan cualquier fenómeno de degradación durante las etapas de sinterización posteriores. Además, se ha demostrado que los materiales sintetizados por esta vía tienen mejores características biológicas, así como respuestas bioactivas más eficientes, en relación con los materiales formados por los métodos tradicionales [3 y 4].

Por tal razón, la finalidad de este trabajo de investigación, es proponer una combinación de dos tipos de hidroxiapatita, producidas mediante la técnica sol-gel, con las propiedades de bioactividad más eficientes, evaluados mediante la inmersión de estos materiales en una solución fisiológica simulada (SBF).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

- Síntesis, caracterización y evaluación las propiedades bioactivas de biomateriales compuestos de hidroxiapatita carbonatada/hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad, formulados con varias proporciones de ambos biocerámicos.

1.2.2. Objetivos particulares

- Síntesis de hidroxiapatita carbonatada mediante una técnica sol-gel, utilizando como agentes precursores de calcio y fósforo los reactivos siguientes: acetato de calcio y trietil fosfato en medio acuoso.

- Síntesis de hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad mediante una técnica sol-gel, utilizando como agentes precursores de calcio y fósforo los reactivos siguientes: nitrato de calcio y fosfato de amonio en medio acuoso.
- Producir compósitos de estos biocerámicos, variando la proporción de los mismos.
- Evaluar su solubilidad y bioactividad, sumergiéndolos en una solución fisiológica simulada (SBF).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ¿Qué es un Material?

En la rama de la ingeniería se define como material a toda aquella sustancia cuyas propiedades físicas, químicas o mecánicas son útiles para un fin.

Clasificación de los materiales:

Materiales Naturales

Son aquellos que se encuentran en la naturaleza.

- Animales
- Vegetales
- Minerales

Materiales Sintéticos

Materiales creados por el hombre a partir de materiales naturales (compuestos, aleaciones)

2.2. Biomateriales

En el año 1986 “The European Society for Biomaterials Consensus Conference” definió: un biomaterial es una sustancia o material usado solo o en la fabricación de un aparato médico diseñado para interactuar con los tejidos humanos en el monitoreo de funciones corporales o para tratar alguna condición patológica del cuerpo.

El biomaterial es inerte y tiene la capacidad de integrarse en un material vivo con el objetivo de sustituir o regenerar tejido. Algunos biomateriales se encuentran fuera del cuerpo como es el caso de las prótesis dentales aun así siguen expuestos a los fluidos corporales. Es por eso que una de las características principales de los biomateriales es la biocompatibilidad, la cual es la capacidad que tiene un material de soportar la degradación dentro de un cuerpo vivo y la biodegradabilidad el tiempo que le tomara al material degradarse dentro del cuerpo vivo. Es importante que el material no libere sustancias tóxicas para el cuerpo. Otras propiedades

importantes son las mecánicas como la resistencia y la fatiga. En base a estas características se clasifican los biomateriales [5].

2.3. Clasificación de los Biomateriales

Según su naturaleza

- Metales
- Polímeros
- Cerámicos

En función de la respuesta del propio organismo:

- Inertes
- Bioactivos
- Reimplantados
- Biodegradables
- No degradables

2.3.1. Biomateriales metálicos

Para que un metal sea utilizado como biomaterial debe de cumplir algunas características. Debe ser tolerado por el organismo, soportar la corrosión ya que se encontrará en contacto constante con los fluidos corporales. Los metales presentan excelentes características de conductividad eléctrica, térmica y a sus propiedades mecánicas. Normalmente se utilizan como prótesis para tejidos duros como cadera, articulaciones de rodilla, reparación de fracturas y tornillos. Los principales metales utilizados en aleaciones para la fabricación de implantes son el hierro (Fe), el cromo (Cr), cobalto (Co), níquel (Ni), titanio (Ti), tantalio (Ta), niobio (Nb), molibdeno (Mo), y el tungsteno (W).

2.3.2. Biomateriales poliméricos

Los polímeros ofrecen una gran versatilidad tanto en forma ya que se pueden conformar en fibras, tejidos, películas y bloques. Poseen una gran bioestabilidad y características bien determinadas. Son biodegradables y gracias a esto son de gran

ayuda en como implantes temporales, utilizándose como cementos óseos, injertos vasculares, válvulas cardiacas, corazones artificiales, implantes mamarios, lentes de contacto, capsulas farmacéuticas entre otros.

2.3.3. Biomateriales cerámicos

Son los materiales más parecidos al componente mineral del hueso, tienen buena biocompatibilidad y oseointegración. Sin embargo, no les es posible soportar grandes zonas de carga debido a su carácter rígido lo que limita su aplicación. Se emplean como implantes porosos para relleno de cavidades óseas en áreas sin soporte de carga, como pequeños implantes densos en el oído medio, como recubrimiento sobre implantes metálicos y como fase bioactiva en materiales compuestos. Los cerámicos se clasifican en: sólidos cristalinos, sólidos amorfos como los vidrios y sólidos amorfos con núcleos de cristalización como los vitrocerámicos. También se clasifican por su actividad química dentro del organismo: bioinertes, bioactivos y biorreabsorbibles.

2.3.4. Biocerámicos bioinertes

Los materiales bioinertes son aquellos materiales que tienen una reacción nula al interactuar con tejidos vivos. Esto quiere decir que no son insolubles en el organismo y no afecta las células del organismo. Otra característica importante de los bioinertes es que son absorbidos rápidamente por el organismo creando una superficie de tejido vivo sobre el implante. Uno de los cerámicos más utilizados es la alúmina, pero debido a su alto módulo de elasticidad soportando mayor parte de los esfuerzos lo que termina por debilitar o atrofiar el hueso.

2.3.5. Biocerámicos bioactivos

Estos materiales desarrollan una fuerte unión con el tejido óseo derivado de las reacciones entre el material y el fluido corporal formando una capa de material nuevo. Es por eso que despiertan gran interés en la industria clínica. Tal es el caso de la hidroxiapatita carbonatada un biocerámico que al entrar en contacto con el medio fisiológico forma una capa de material nuevo.

2.3.6. Biocerámicos biorreabsorbibles

Estos materiales son reabsorbidos por el organismo lo cual permite que interactúen con el tejido mientras se corrige el defecto. Un ejemplo es β -TCP, que se reabsorbe por acción de células óseas aportando in situ de Ca y P de forma continua y aparición de porosidad progresiva con el tamaño de poro adecuado permitiendo el crecimiento del hueso mientras el β -TCP es biodegradado.

2.3.7. Biomateriales compuestos o compósitos

Los polímeros y los cerámicos son capaces de combinarse para producir materiales compuestos o compósitos reuniendo así las mejores características biológicas y mecánicas de los materiales originales. Tanto los biomateriales cerámicos como los polímeros son capaces de combinarse para producir compuestos para formar nuevos materiales [6-8].

2.4. Biocerámicos de Fosfato de Calcio

Dentro de los biocerámicos los compuestos basados en fosfatos de calcio son los que mayormente se utilizan debido a que su composición química es casi la misma presentada en los esqueletos de los vertebrados, permitiendo intercambio de algunos iones cuando se encuentra en contacto con fluidos biológicos presentando una excelente biocompatibilidad. Después de un cierto tiempo ejercen una unión química con el hueso llegando a incorporarse en el tejido óseo. Dentro de estos compuestos se encuentran tales como hidroxiapatita (HA), fosfatos tricálcicos (α -TCP y β -TCP), fosfato dicálcico dihidratado (DCPD), y fosfato tetracálcico (TTCP), HA, β -TCP y los compuestos bifásicos constituidos por una mezcla de en proporción variable de HA y β -TCP. Cada uno de estos materiales presenta características fisicoquímicas específicas y propiedades biológicas variables [9-11].

2.4.1. Propiedades fisicoquímicas

Solubilidad en fluidos biológicos

La propiedad más importante de los fosfatos de calcio probablemente es su solubilidad en el agua, ya que en función de esta puede predecirse el

comportamiento in vitro de estos materiales. Si la solubilidad de un fosfato de calcio, es menor que la parte del mineral del hueso, este se degradará sumamente despacio, por ejemplo, la hidroxiapatita. Por otro lado, si su solubilidad es mayor que la parte mineral del hueso, este se degradará rápidamente. Sin embargo, la superficie de un fosfato de calcio altamente soluble puede ser reactiva y puede cubrirse con un fosfato de calcio débilmente soluble, reduciendo así su velocidad de degradación. Tanto in vitro como in vivo, los fosfatos de calcio son solubles en fluidos biológicos [12].

La hidroxiapatita corresponde al cerámico de fosfato de calcio menos soluble y se reabsorbe lentamente en aproximadamente 1 % de su volumen por año desde su implantación. Evaluar la solubilidad de estos materiales es importante, ya que permite la posibilidad de que estos materiales sean reemplazados progresivamente por el hueso, mientras se biodegradan [6].

Estructura cristalina y cristalinidad

La estructura cristalina y cristalinidad está en función de las condiciones de preparación.

La cristalinidad es la propiedad que refleja el tamaño y la perfección de los cristales y modifica su solubilidad. La solubilidad se ve afectada por el tamaño del cristal entre más pequeño es la disolución ocurre más rápidamente.

Porosidad

En los cerámicos existe dos tipos de porosidad: microporosidad y macroporosidad. En la microporosidad el espacio entre los cristales es de 1-10 μm de diámetro, dentro de ellos se distribuyen fluidos biológicos.

El espacio entre los cristales en la macroporosidad se debe a la adición de un generador de poros en su preparación, dichos poros tienen un tamaño entre 100-

600 μm en los cuales se puede dar la colonización de células óseas permitiendo el crecimiento óseo en los intersticios del implante.

Tabla I. Características de algunos biomateriales según su clasificación [6].

Material	Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
METÁLICOS			
Co-Cr-Mo Ti-6Al-4V Ti Acero 316L Nitinol (Ni-Ti) AgPdAu	Alta resistencia transversal y de tensión.	Carecen de compatibilidad completa con el medio fisiológico. Desajuste de las propiedades mecánicas con el sistema músculo-esqueleto. Corrosión en Acero 316L.	Fijación ortopédica: tornillos, clavos, alambres, placas, barras intermedulares, implantes dentales.
POLIMÉRICOS			
Polietileno: (LDPE, HDPE, UHMWPE) Poli(etilentereftalato) ePTFE (Gore Tex™) Silicona Polimetil metacrilato (PMMA) Poliuretano	Alta resistencia al desgaste Elasticidad. Fácil moldeo y diseño de propiedades.	Baja resistencia transversal y compresiva. Alto régimen de deformación. Falta de compatibilidad con medio fisiológico.	Ortopédicos. Tendones artificiales. Músculos artificiales. Injertos vasculares. Reconstrucción de tejido blando.
CERÁMICOS			
Alúmina Zirconia Fosfato Tricálcico Hidroxiapatita Carbón pirolítico Silicatos de Calcio Vidrios bioactivos	Compatibilidad con sistema músculo-esqueleto. Similitud con propiedades físicas del hueso. Resistencia a la corrosión. Inertes a los tejidos. Adherencia a los tejidos. Alta resistencia a compresión. Alta resistencia al desgaste.	Baja resistencia a tensión, corte e impacto. Difícil conformación. Falta de elasticidad. Baja reproducibilidad de Propiedades mecánicas. Sensibilidad al mellado. Falta de resistencia.	Ortopédico. Revestimiento de metales. Válvulas cardíacas Odontológico.
COMPÓSITOS			
Hidroxiapatita-Polietileno Alumina-Zirconia Polímero reforzado con fibra de carbono (CFRC)	Compatibilidad con sistema músculo- esqueleto. Adherencia a tejidos. Sin corrosión-degradación. Alta resistencia.	Falta de resiliencia. Difícil fabricación. Propiedades mecánicas e interfaciales poco conocidas.	Ortopédico. Válvulas cardíacas.

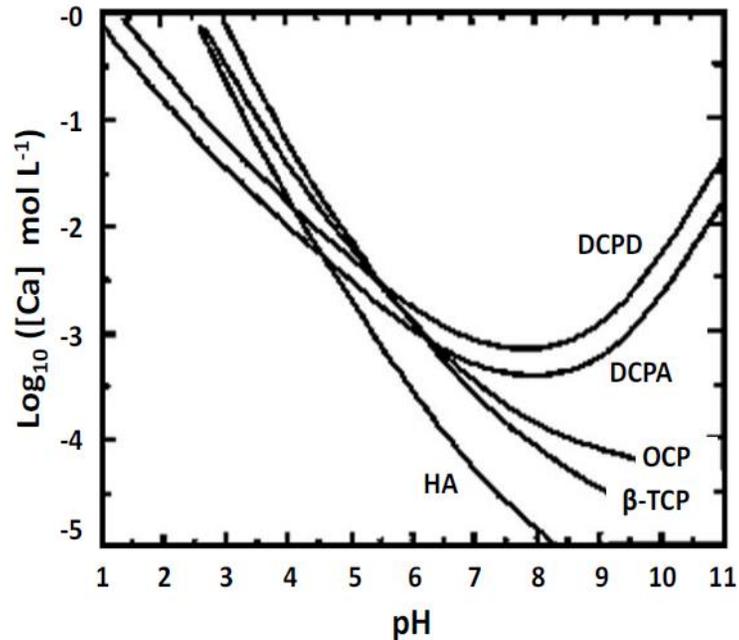


Figura 1. Isotermas de solubilidad para diferentes compuestos de fosfato de calcio a 37°C. La solubilidad esta expresada por la cantidad de iones de calcio en solución en función del pH [6].

La porosidad afecta la solubilidad, tendencia de reabsorción y propiedades mecánicas del material pues estas dependen tanto de la relación Ca/P y su microestructura. La solubilidad y la actividad biológica del material se ven aumentadas con la porosidad, sin embargo esto también deteriora sus propiedades mecánicas.

Por otro lado la reabsorción o biodegradación de los cerámicos de fosfatos de calcio se pueden originar por su disolución química, que depende del tipo de material y el pH del medio. El pH puede degradar el material a causa de un ataque químico. Otros de los factores que pueden aumentar la biodegradación son el aumento de área superficial, disminución de la cristalinidad y homogeneidad de los cristales, disminución del tamaño de grano y sustituciones iónicas con CO_3^{2-} , Mg^{2+} o Sr^{2+} . Los factores que disminuyen la biodegradación son la existencia de flúor en la hidroxiapatita, la presencia de Mg^{2+} en el fosfato tricálcico y la disminución de la relación HA/β-TCP en los compuestos bifásicos.

Actualmente los cerámicos de fosfatos de calcio se emplean como implantes para rellenar cavidades en áreas sin soporte de carga, pequeños implantes en el oído medio y recubrimiento sobre implantes metálicos.

El enlace con el hueso se establece mediante el crecimiento de pequeños cristales de apatitas biológicas sobre el implante [13-16].

2.5. Biocompatibilidad de Biocerámicos de Fosfatos de Calcio

La resistencia que tiene un material a la degradación y corrosión ante las condiciones dentro de un cuerpo vivo (temperatura, pH). Es la aceptabilidad biológica y se caracteriza por la ausencia de toxinas, el material no debe liberar sustancias que dañen la integridad del cuerpo en el que se encuentran implantados. Tampoco deben presentarse inflamación o reacciones alérgicas. La inflamación es una respuesta negativa del cuerpo ocasionada por toxinas o alergias en la que se busca expulsar el implante.

2.6. Bioactividad de Biocerámicos de Fosfatos de Calcio

Es la capacidad de un material para inducir, estimular, provocar o modular una acción biológica definida en el tejido receptor, posibilita una respuesta biológica específica en su interface con los tejidos favoreciendo el enlace de ambos.

El factor determinante de la bioactividad es el equilibrio entre la fase estable del biomaterial, la fase biodegradable por contacto con los fluidos biológicos y la fase biorreabsorbible.

Se requieren distintas clases de biomateriales según el uso quirúrgico a que se destinen. Los polímeros se usan cuando se requieren formas complicadas o gran flexibilidad; los metales cuando el implante tendrá que soportar altas cargas mecánicas, y los "compósitos" se usan para mejorar la interacción con los tejidos. El lugar que ocupan las cerámicas está aumentando su importancia tanto por su biocompatibilidad como por la resistencia a la corrosión que tienen, pero

principalmente porque una parte importante de los huesos son fases minerales. Actualmente, se emplean cerámicos para sustituir hueso y para promover su regeneración. Los materiales naturales se prefieren por su disponibilidad y porque el problema del rechazo no se presenta cuando provienen del mismo paciente, aunque puede ser determinante en caso contrario [6].

2.7. Hidroxiapatita

La hidroxiapatita estequiometría ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) tiene una relación molar Ca/P = 1.67. La estructura de la hidroxiapatita permite la sustitución de Ca, PO_4 y OH por iones fluoruro (F^-), cloruro (Cl^-) y carbonatos (CO_3^{2-}) dando cambios en sus propiedades, morfología, solubilidad, etc; pero sin tener cambios significativos en su simetría hexagonal. Una de las sustituciones más importantes es la de los carbonatos (CO_3^{2-}), los cuales pueden sustituir tanto a los grupos hidroxilo (OH) como a los grupos fosfatos (PO_4) designando estas sustituciones como Tipo A y Tipo B respectivamente, siendo esta última sustitución, la composición más parecida a la estructura de la fase mineral de los huesos y dientes, las cuales se denominan apatitas biológicas. Las apatitas biológicas difieren de la hidroxiapatita pura en estequiometría, composición, cristalinidad, y algunas propiedades físicas y mecánicas. Generalmente, las apatitas biológicas son deficientes en calcio, (Ca/P = 1.5-1.65) presentando la sustitución de grupos fosfato por grupos carbonatos, por tal razón, también se refiere a ellas como hidroxiapatitas carbonatadas del Tipo B. [17] [18]

2.8. Proceso Sol-Gel

Un sol es una dispersión de partículas coloidales, para obtener materiales con un tamaño de partícula hasta del orden de nanómetros, en un líquido. Este proceso consiste en la formación de un gel el cual es una red tridimensional interconectada, formada a partir de un líquido, donde los elementos inorgánicos son obtenidos a través de dos reacciones químicas simultáneas que son el hidrolisis y la condensación, estas se inician a partir de una solución homogénea de alcóxido y solvente orgánico generalmente alcohol. La técnica Sol-Gel utiliza una ruta de baja

temperatura para la síntesis y el recubrimiento de cerámicos. Como la síntesis de hidrólisis se llevan a cabo en condiciones manejables, HA con diferentes proporciones de Ca: P se obtienen fácilmente. Otra ventaja de este método es que se puede aplicar a un sustrato que tiene forma complicada, como un sustrato poroso [19].

2.8.1 Ruta Sol-Gel Alternativa

La diferencia entre la ruta alternativa del proceso Sol-Gel y la tradicional radica en los precursores utilizados y el tipo de hidroxiapatita obtenida. A partir de la ruta sol-gel tradicional se logra sintetizar hidroxiapatita carbonatada la cual es la misma que se encuentra en los dientes y huesos humanos mientras que a partir de la ruta sol-gel alternativa se obtiene hidroxiapatita estequiométrica. En el método sol gel tradicional se utiliza nitrato de calcio y fosfato de amonio los cuales tienen un costo mucho menor que el acetato de calcio y el trietil fosfato requeridos en el método tradicional. [6] [7]

2.8.2. Etapas Fundamentales

La técnica Sol-Gel se puede clasificar en cuatro etapas fundamentales:

- Preparación del Sol.
- Gelificación.
- Envejecimiento.
- Secado y tratamiento térmico.

Preparación del Sol

Un sol puede obtenerse utilizando dos vías diferentes: los sistemas acuosos y los sistemas orgánicos. En los sistemas acuosos se utilizan como precursores óxidos, hidróxidos y sales tanto orgánicas como inorgánicas, estos compuestos se dispersan o se disuelven en agua. Los sistemas orgánicos se obtienen a partir de compuestos metal-orgánicos (principalmente alcóxidos) disueltos en un solvente orgánico, que generalmente es un alcohol. Durante esta etapa se desarrollan

reacciones de “hidrólisis” de los alcóxidos metálicos (M-OR) con el agua, formándose hidróxidos metálicos (M-OH). Así mismo, los hidróxidos metálicos se combinan (M-OH + HO-M o M-OR + HO-M) para producir un óxido metálico (M-O-M), liberando además una molécula de agua o de alcohol, razón por la cual, esta segunda reacción recibe el nombre de “condensación”

Gelificación

Las reacciones de hidrólisis y condensación del proceso anterior, conducen a la formación de agregados, que se enlazan hasta formar un único agregado gigante denominado gel. En el momento de formación del gel hay muchos agregados en el sol que se unen entre sí para formar una red sólida, responsable de la elasticidad, ocurriendo un cambio abrupto de la viscosidad.

Envejecimiento

Después la gelificación el sistema continúa reaccionando, dando lugar a reacciones como: 1) Polimerización, con la cual se aumenta la interconexión del esqueleto sólido, en consecuencia aumenta la densidad y la resistencia mecánica del sólido, 2) Sinéresis, en la cual ocurre la contracción del esqueleto sólido del gel, acompañada de la expulsión de la fase líquida contenida en los poros, 3) Maduración, el cual se debe a la disolución y precipitación producida por la diferencia de solubilidad entre las partículas, y finalmente, 4) Cambios de fase, los cuales pueden ocurrir en todo el proceso de envejecimiento, por ejemplo, puede ocurrir que la fase líquida se divida en dos fases, también puede ocurrir la cristalización de sales utilizadas en sistemas multicomponentes.

Secado y Tratamiento Térmico

El secado de la fase líquida la cual constituye la mayor parte del volumen del gel húmedo, (70-90%), ocurre mediante evaporación, la cual causa una contracción acompañada de endurecimiento del gel, estos geles secos también reciben el nombre de “xerogeles”. Durante el tratamiento térmico ocurren una serie de cambios físicos y químicos en los materiales, los cuales pueden llevar a la transformación de fases existentes y la aparición de nuevos compuestos. Estos cambios pueden ser analizados mediante técnicas como el análisis térmico, entre otras [19-24].

2.9. Fluido Fisiológico Simulado (SBF)

En 1991 Tadashi Kokubo desarrolló un fluido celular fisiológico simulado el cual contiene una concentración de iones inorgánicos similar a la que posee el fluido extracelular humano, a fin de reproducir la formación de apatita en materiales bioactivos colocados in vitro. Estos fluidos fisiológicos simulados, comúnmente se abrevian SBF por sus siglas en inglés (Simulated Body Fluids) y en ocasión también son llamados “Solución de Kokubo” [25].

El SBF se puede utilizar para la evaluación no sólo de la bioactividad de materiales artificiales in vitro, también en el recubrimiento de apatita sobre diferentes materiales bajo condiciones biomiméticas [6, 23]. La Tabla II muestra una comparación entre la concentración iónica del fluido fisiológico simulado (SBF) y el plasma sanguíneo humano.

Tabla II. Concentración iónica del fluido fisiológico simulado (SBF) propuesto por Kokubo, comparada con el plasma sanguíneo humano [23].

Concentración de los iones (mM)								
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.20	1.0	0.5
Plasma Sanguíneo	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5

pH ajustado a 7.4 por adición de Tris-(Hidroximetil)-aminometano (CH₂OH)₃CNH₂) y HCl 1M a 37°C.

III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1. Materiales y Equipo

Para la síntesis del hidroxiapatita se utilizaron los siguientes reactivos.

- Nitrato de Calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (s). 99% pureza, marca Sigma - Aldrich, USA.
- Fosfato de Amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) (s). 99% pureza, marca Sigma - Aldrich, Japón.
- Amoniaco (NH_4) (l). Mínimo de pureza 25%, marca Merck.
- Acetato de Calcio ($\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$)
- Trietil fosfato ($(\text{POC}_2\text{H}_5)_3$).
- Agitador Ultrasónico
- Placas de calentamiento y agitación
- Secador
- Horno de Alta temperatura Incubadora

3.2. Metodología Experimental

3.2.1. Método I: Síntesis hidroxiapatita estequiométrica

Para la síntesis de hidroxiapatita estequiométrica se procedió de la siguiente manera:

Primeramente en un vaso de precipitados de 100 mL, se agregan 10 mL de agua deionizada. ii) Después se agregan 0.1639 moles de nitrato de calcio, agitando la solución durante 15 minutos en un baño ultrasónico. iii) Posteriormente se agregan 0.0979 moles de fosfato de amonio y nuevamente se agita en el baño ultrasónico por un lapso de 30 minutos, esto hasta que se mezclen totalmente los reactivos precursores. iv) El material se somete a una nueva etapa de agitación, ahora por acción magnética por un lapso de 2 horas, durante esta etapa se inicia el monitoreo constante del pH, mismo que se controla entre los valores de 6 y 7, con la adición de amoníaco líquido, hasta obtener el xerogel húmedo. v) Seguidamente el xerogel húmedo se somete a un tratamiento de secado por un lapso de 12 horas, a una

temperatura de 120°C. vi) Una vez obtenido el xerogel seco, éste se somete a un tratamiento térmico hasta 750°C, con una rampa de calentamiento de 10°C por minuto, manteniéndose a esta temperatura por 3 horas, con el fin de hacer reaccionar todos los componentes de la muestra. Terminada esta etapa, el material se deja enfriar dentro del horno apagado, por un período de 12 horas, obteniéndose aproximadamente 1.0 gr de hidroxiapatita. En la Figura 2 se muestra el diagrama de flujo seguido para esta técnica.

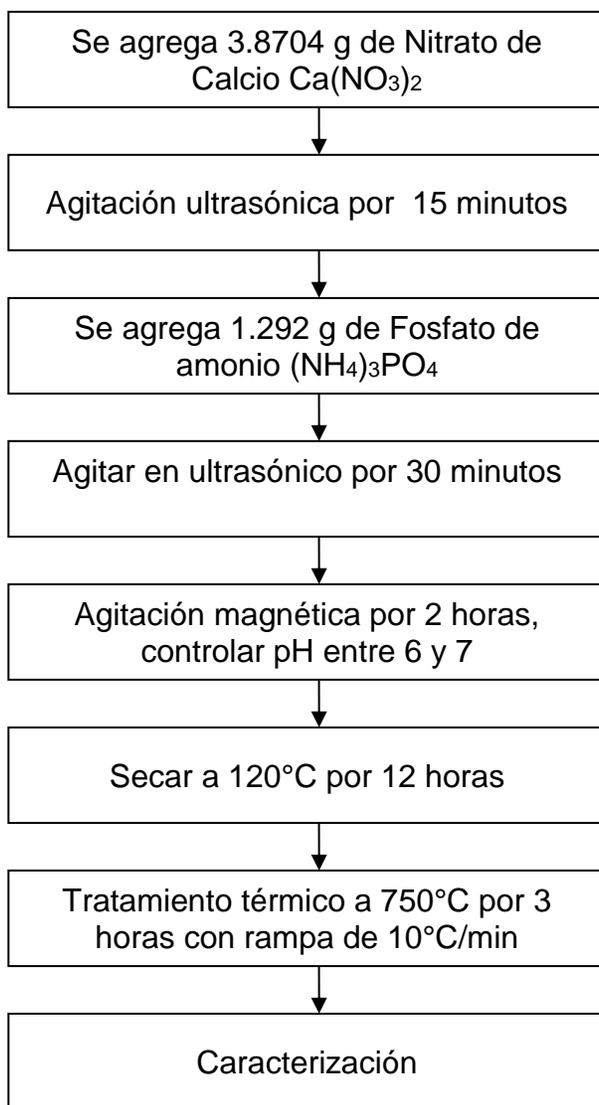


Figura 2. Diagrama de flujo para la síntesis de hidroxiapatita estequiométrica por el método sol-gel.

3.2.2. Método II. Síntesis de hidroxiapatita carbonatada

Para la síntesis de hidroxiapatita carbonatada de alta cristalinidad, se procedió de la siguiente manera:

Primeramente en un vaso de precipitados de 100 mL se agregan 5 mL de agua destilada. ii) Posteriormente se agregan 0.02 moles de acetato de calcio al 99% agitando la mezcla durante 20 minutos en un baño ultrasónico. iii) Seguidamente se agregan gota a gota 0.012 moles de trietil fosfato al 99.8%, la mezcla de precursores y agua se deja por 30 minutos adicionales en el baño ultrasónico. iv) La mezcla se somete a una serie de calentamientos sucesivos, inicialmente a una temperatura de 35°C durante 12 horas, seguido por un calentamiento a 45°C, durante las 12 horas siguientes, para finalizar con un calentamiento adicional de 12 horas a 75°C, etapa durante la cual se observa la gelificación del material. v) Seguidamente el xerogel húmedo obtenido, se somete a un tratamiento de secado, por un lapso de 12 horas, a una temperatura de 120°C. vi) Una vez obtenido el xerogel seco, éste se somete a un tratamiento térmico hasta 1000°C, con una rampa de calentamiento de 10°C por minuto, manteniéndose a esta temperatura por 5 horas, con el fin de hacer reaccionar todos los componentes de la muestra. Terminado esta etapa se deja enfriar dentro del horno apagado por un periodo de 12 horas. vii) El último paso consiste en lavar el producto obtenido del tratamiento térmico con 50 mL de solución de HCl 0.01M, agitándose por 2 horas. Para remover el exceso de ácido y de sales solubles, se filtra la solución anterior con papel filtro Walkman no. 42 y el producto se lava con 1 L de agua deionizada, para finalmente dejarlo secar durante 2 horas a 120°C, obteniéndose aproximadamente 1.0 gr de hidroxiapatita.

En la Figura 3 se muestra el diagrama de flujo seguido para esta técnica.

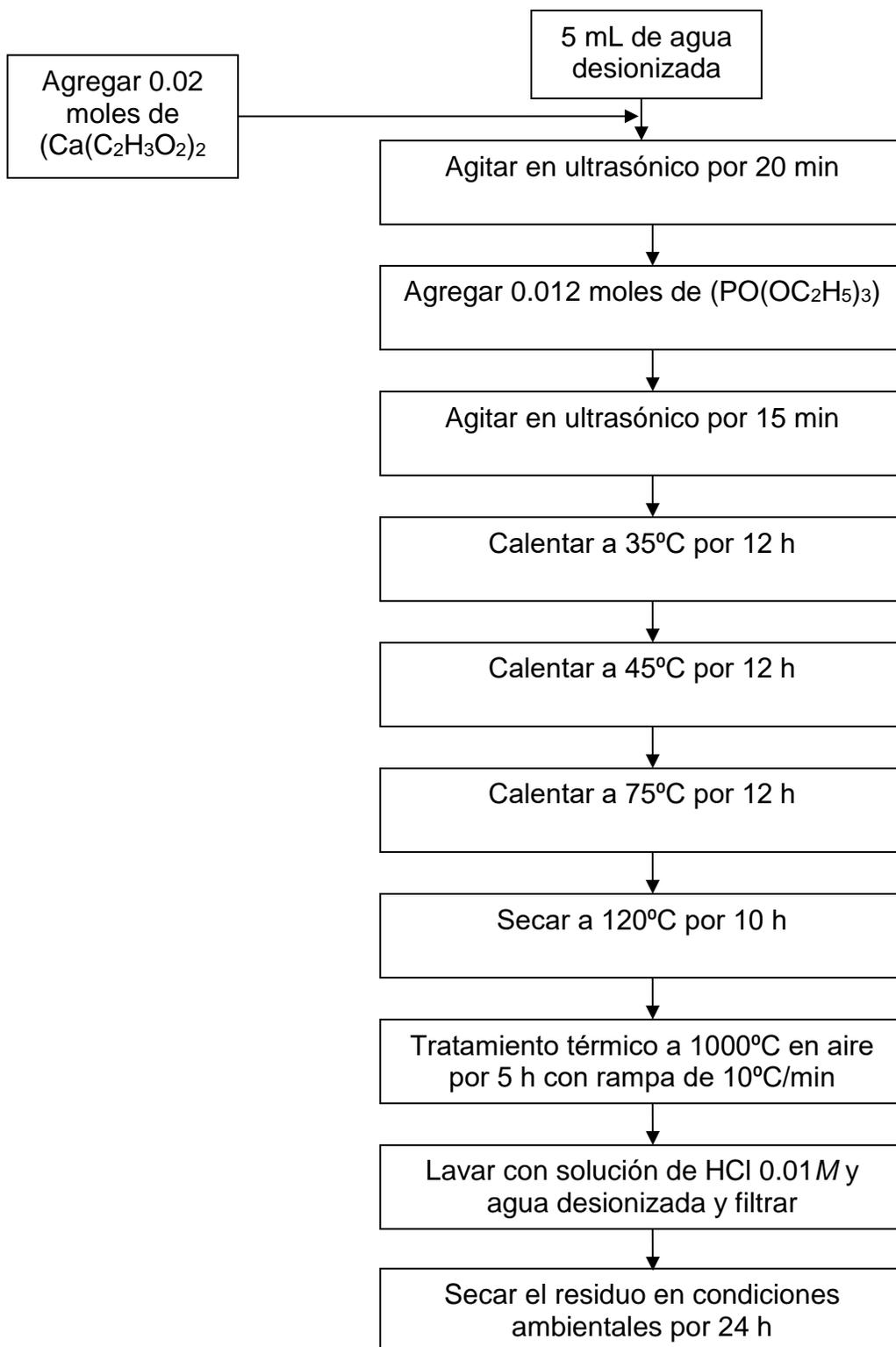


Figura 3. Diagrama de flujo para la síntesis de hidroxapatita carbonatada por el método sol-gel.

3.3. Formulación de los Biomateriales Compuestos de Hidroxiapatita Carbonatada / Hidroxiapatita Estequiométrica

Para producir los compósitos de hidroxiapatita carbonatada / hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad se procedió a desarrollar mezclas directas en diferentes proporciones de ambos compuestos produciendo materiales con 100% hidroxiapatita carbonatada, 100% hidroxiapatita estequiométrica, 20% hidroxiapatita carbonatada / 80% hidroxiapatita, estequiométrica, 50% hidroxiapatita carbonatada / 50% hidroxiapatita estequiométrica, 80% hidroxiapatita carbonatada / 20% hidroxiapatita estequiométrica, codificados como 100HC, 100HE, 20HC-80HE, 50HC-50HE, 80HC-20HE, respectivamente; todos los porcentajes fueron en peso sobre la base total de 0.5 gramos. Con estas formulaciones se evaluó la bioactividad de las fases individuales combinadas según las proporciones antes mencionadas. Esta propiedad se evaluó sumergiendo 0.5 gramos de cada compósito en 40 ml de una solución fisiológica simulada (SBF) analizando, la concentración de los iones y el pH en solución así como la superficie de las partículas durante 1, 2 y 3 semanas

3.4. Técnicas de Análisis de los Biomateriales Compuestos de Hidroxiapatita

Análisis térmico (ATG/ATD)

Para detectar las transformaciones que ocurren en los materiales con la modificación de su temperatura se utilizó el ATG, en combinación con el ATD. Ambos análisis se desarrollaron en un equipo analizador simultáneo DSC-TGA (TA Instruments SDT 2990, New Castle, DE), mostrado en la Figura 7. El intervalo de calentamiento fue de temperatura ambiente hasta 1000⁰C, a una velocidad de 10⁰C/min con un flujo de aire de 23 cm³/min. Se utilizaron 3 mg de muestra colocados sobre 10 mg de alúmina.

Difracción rayos-X (DRX)

Los patrones de difracción de rayos-X se obtuvieron con un difractómetro de polvos Phillips X'PERT (Phillips Electronics, N.V. Eindhoven, Netherlands), con radiación

CuK λ (40 mA, 45 KV) y velocidad de barrido de 1.2⁰/ min. En ambos casos, variando el ángulo 2 θ desde 10⁰ hasta 80⁰.

Espectroscopía Infrarroja de Transformadas de Fourier (FT-IR)

En las caracterizaciones de este estudio se utilizó un espectrómetro FT-IR Thermo Scientifics Nicolet iS50, en el rango de 4000-400 cm⁻¹. Las muestras fueron analizadas en modo de transmisión.

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Para el análisis de la morfología externa de los materiales se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL-5300 (Tokyo, Japan), todas las micrografías presentadas se obtuvieron sin ningún tipo de recubrimiento de los materiales.

Espectroscopia de Absorción Atómica (AA) y Colorimetría

Para la evaluación de la solubilidad determinando los cambios en la concentración de los iones Ca y P, así como los cambios de pH de la solución SBF durante el período de inmersión de las muestras, se utilizó en equipo de Absorción atómica (Perkin-Elmer Analyst 400) un colorímetro y un medidor de pH respectivamente.

3.5. Evaluación de las Propiedades Bioactivas

3.5.1. Preparación del Baño Fisiológico Simulado (SBF)

La solución SBF se formuló a partir de los reactivos y las cantidades siguientes:

- Cloruro de sodio, (NaCl, 99%, Jaltek, NL, México), 7.996 g/L.
- Bicarbonato de sodio, (NaHCO₃, 99.7%, Jaltek, NL, México), 0.350 g/L.
- Cloruro de potasio, (KCl, 99%, Jaltek, NL, México), 0.224 g/L.
- Fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄·3H₂O, 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 0.228 g/L.
- Cloruro de magnesio hexahidratado, (MgCl₂·6H₂O, 99.3%, Jaltek, NL, México), 0.305 g/L.
- Cloruro de calcio, (CaCl₂, 97.7%, Jaltek, NL, México), 0.278 g/L.
- Sulfato de sodio, (Na₂SO₄, 99%, Jaltek, NL, México), 0.071 g/L.
- Tris-(hidroximetil)-aminometano, ((CH₂OH)₃CNH₂, 99.8%, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ), 6.057 g/L.
- Ácido clorhídrico, (HCl, Fermont, NL, México), 1M.

En la preparación de la solución SBF debe evitarse el uso de recipientes de vidrio, ya que sobre su superficie puede inducirse la nucleación de apatita. En su lugar se deben utilizar recipientes de plástico con superficies suaves. La solución SBF se preparó en un recipiente de plástico, disolviendo las cantidades apropiadas de cada uno de los reactivos en agua deionizada, añadiéndolos uno por uno, en el orden indicado anteriormente, hasta que cada reactivo se disolvió completamente. Se consumieron aproximadamente 40 mL de HCl 1M, para ajustar el pH a 7.4 en 1 L de solución. La solución SBF es una mezcla súper saturada, cualquier método de preparación inapropiado puede generar una precipitación. Por tal razón, en todo momento durante la elaboración, se debe distinguir una solución transparente, libre de cualquier indicio de precipitación. Si aparece cualquier tipo de precipitado, la preparación debe detenerse, eliminando la solución y empezar de nuevo con otra preparación.

Para preparar 1 L de solución, los reactivos se disolvieron en 700 mL de agua deionizada, la cual se ajusta previamente a 37°C en una placa calefactora provista de agitación magnética. Aproximadamente el 90% del ácido clorhídrico se añade antes de agregar el cloruro de calcio. Después de agregar el sulfato de sodio, el volumen de la solución se ajustó a 900 mL con agua desionizada, manteniendo la temperatura a 37°C. Se introdujo el electrodo de pH en la solución, justo antes de agregar el tris-(hidroximetil)-aminometano, el pH de la solución se encontró $\approx 2.0 \pm 1.0$. Se añadió el tris-(hidroximetil)-aminometano poco a poco, esperando a que se disolviera completamente y observando el aumento gradual de pH en la solución, hasta que ésta alcanzó un valor de pH ≈ 7.3 . Este reactivo no debe agregarse de forma rápida, ya que un incremento radical del pH puede ocasionar una precipitación de fosfato de calcio en la solución. Seguidamente se ajustó la temperatura a 37°C y se agregó más tris-(hidroximetil)-aminometano hasta alcanzar un valor de pH ≈ 7.45 en la solución. Posteriormente se añadió en gotas la cantidad de HCl 1M necesaria para ajustar el pH ≈ 7.42 , agregando de nuevo la cantidad necesaria de tris-(hidroximetil)-aminometano para volver a alcanzar un pH ≈ 7.45 , para bajarlo de nuevo hasta pH ≈ 7.42 con HCl 1M, repitiendo esta operación hasta que todo el tris-(hidroximetil)-aminometano se agregó a la mezcla, ajustando finalmente el pH ≈ 7.42 con HCl 1M.

Finalmente, se retiró de la solución el electrodo de pH, se lavó con agua deionizada y ésta se agregó a la solución. La solución se retiró del recipiente plástico y se colocó en un recipiente volumétrico, la superficie del recipiente plástico se lavó en repetidas ocasiones con agua deionizada, esta agua de lavado se añadió a la solución, llenando casi hasta la marca de 1 L. Considerando que la disminución de la temperatura puede afectar el volumen de la solución, el recipiente se tapó, la mezcla se colocó en una placa calefactora hasta alcanzar la temperatura de 37°C. Una vez que se alcanzó esta temperatura, el recipiente se aforó exactamente a 1 L con agua deionizada.

Con esta solución se llevó a cabo la evaluación de la bioactividad de los materiales.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Síntesis de Hidroxiapatita Estequiométrica de Alta Cristalinidad

4.1.1. Análisis térmico (ATG/ATD)

Con el fin de conocer las temperaturas precisas a las cuales es posible obtener hidroxiapatita a partir del xerogel seco, este último fue sometido a un proceso de análisis térmico el cual se presenta en la Figura 4. En esta figura se aprecian dos procesos térmicos importantes el primero aproximadamente a 250°C y el segundo a 650°C; el primer proceso térmico puede deberse a la obtención de hidroxiapatita en las primeras etapas de cristalización, lo cual se evidencia con la drástica pérdida de masa y la aparición de un pico exotérmico, ambos característicos de procesos de cristalización. Esto sucede después de que la humedad y los remanentes de los reactivos precursores fueron eliminados a temperaturas por debajo de los 200°C, mediante un proceso endotérmico como lo muestra la curva de análisis diferencial (DTA). El segundo proceso térmico posiblemente se deba a la producción de hidroxiapatita perfectamente cristalizada, donde también aparece el correspondiente pico exotérmico y una ligera disminución en peso del material; lo anterior se demostrará mediante análisis por difracción de rayos-X de los xerogeles secos tratados a 350°C y 750°C respectivamente.

4.1.2. Difracción de Rayos-X

La Figura 5 muestra los análisis de difracción de rayos-X para el xerogel seco tratado térmicamente hasta 350°C y 750°C respectivamente. El patrón de difracción a 350 °C muestra los planos de difracción correspondientes a la hidroxiapatita, presente en el material como fase única (JCPDS) 09-04-32. Sin embargo, contrastando con el patrón de difracción del material tratado a 750°C se aprecia que esta presenta mayor amplitud en los picos de difracción lo cual demuestra que es un material en sus primeras etapas de cristalización. Para este trabajo de investigación se decidió trabajar con una fase de hidroxiapatita perfectamente cristalizada como la que se muestra en el patrón de difracción de rayos-X del material tratado a 750°

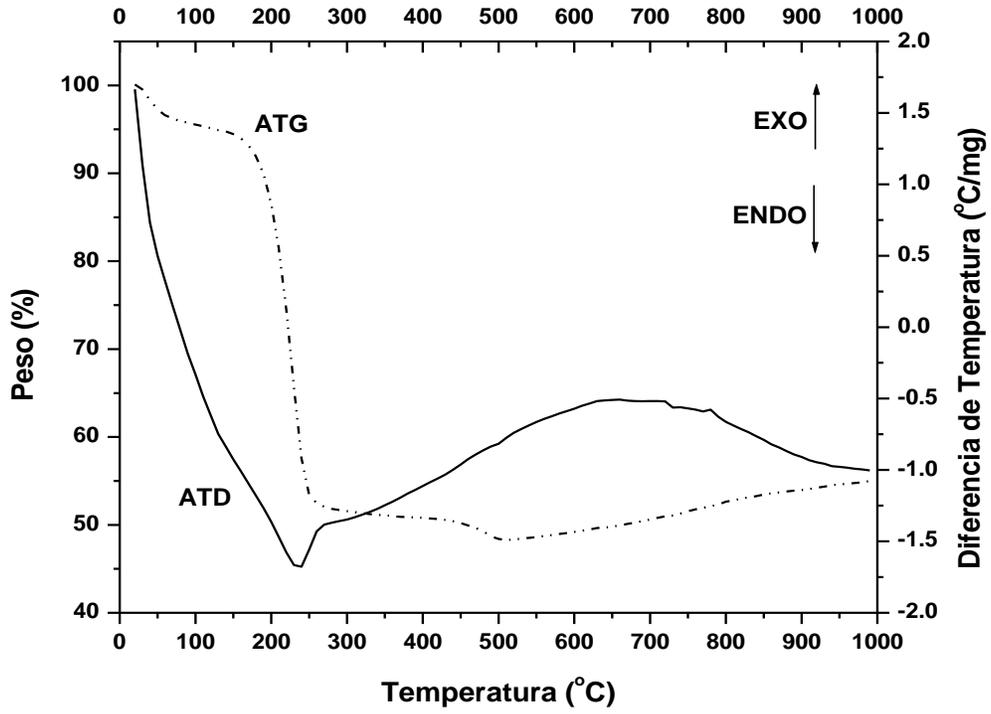


Figura 4. Curvas de análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA) del xerogel seco producido a partir de fosfato de amonio y nitrato de calcio en agua.

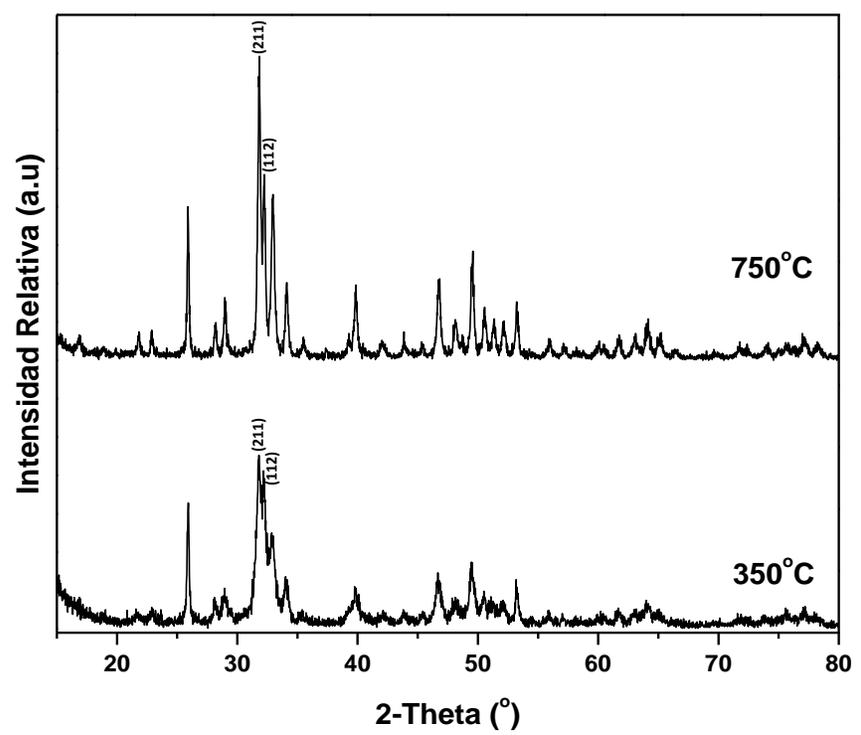


Figura 5. Patrones de difracción de rayos-X del xerogel seco producido a partir de fosfato de amonio y nitrato de calcio en agua, tratado térmicamente a 350°C y 750°C.

Por otro lado, estos patrones de difracción también revelan que el material producido es hidroxiapatita estequiométrica, lo anterior se demuestra observando los planos (211) y (112) perfectamente separados uno del otro, independientemente del nivel de tratamiento térmico. Este es un indicativo de que esta hidroxiapatita no presenta ningún tipo de sustitución por otras especies, como sería el caso de la hidroxiapatita carbonatada en la cual debido a la carbonatación estos dos planos aparecen traslapados.

Por tan razón para producir hidroxiapatita estequiométrica en fase única, en este trabajo de investigación, los xerogeles obtenidos se trataron térmicamente hasta 750°C.

4.1.3. Espectroscopia infrarroja de Transformadas de Fourier

Con el fin de corroborar que efectivamente la estructura de la hidroxiapatita producida por esta técnica estaba libre de carbonatación se realizó la técnica (FTIR), cuyos resultados aparecen en la Figura 6. Esta figura efectivamente no muestra ningún indicio de carbonatación en el material, únicamente se aprecia los componentes propios de la hidroxiapatita estequiométrica: OH movimiento de tensión (3572 cm^{-1}), PO_4 en movimiento de tensión (1037 cm^{-1} y 962 cm^{-1}), OH en movimiento de flexión (602 cm^{-1}). Los ligando asociados con Ca no aparecen en este espectro ya que se presentan en números de onda menores a 400 cm^{-1} .

4.1.4. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

En la Figura 7 se muestra una micrografía de SEM de la hidroxiapatita estequiométrica producida a partir de fosfato de amonio y nitrato de calcio en agua tratado térmicamente hasta 750°C. En esta imagen se aprecia un material formado por partículas con una fuerte tendencia a aglomerarse de forma muy densa.

4.2 Síntesis de Hidroxiapatita Carbonatada

4.2.1. Análisis Térmico (ATG/ATD)

Con el fin de conocer las temperaturas precisas a las cuales es posible obtener hidroxiapatita carbonatada a partir del xerogel seco, este último fue sometido a un proceso de análisis térmico el cual se presenta en la Figura 8. En esta figura se aprecian dos procesos térmicos importantes el primero aproximadamente a 450°C y el segundo a 650°C. Al inicio del calentamiento se puede apreciar una ligera caída en el porcentaje en peso por debajo de los 100°C misma que puede atribuirse a la eliminación de agua físicamente unida. Posteriormente se aprecia ligeras disminuciones sucesivas en el porcentaje en peso las cuales pueden deberse a la eliminación de remanentes de los reactivos precursores utilizados; sin embargo, aproximadamente a 400°C inicia una estrepitosa caída del porcentaje en peso acompañado de un intenso pico exotérmico, lo cual es un claro indicativo de que está sucediendo un proceso de cristalización. Los resultados de los análisis de difracción de rayos-X que se presentaran más adelante, demuestran que a este nivel térmico se obtiene hidroxiapatita acompañada con carbonato de calcio.

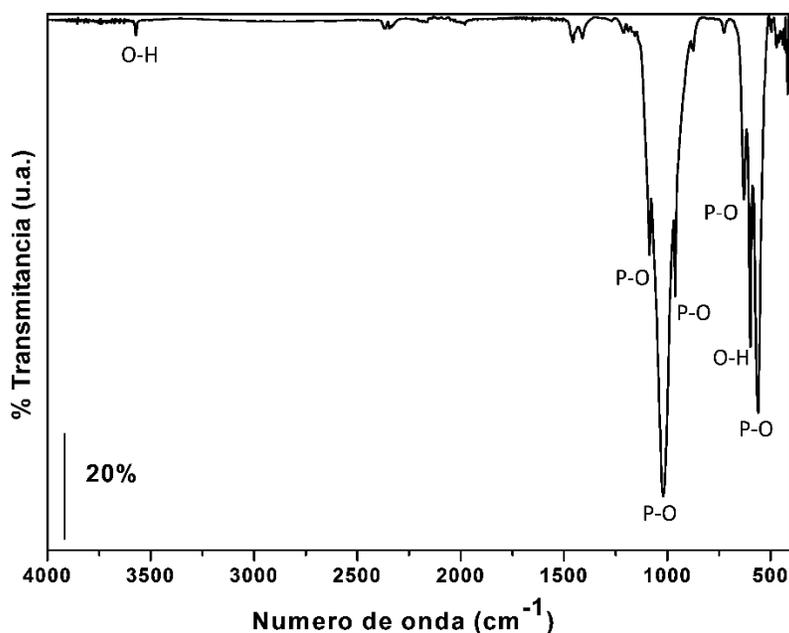


Figura 6. Espectro FT-IR del xerogel seco producido a partir de fosfato de amonio y nitrato de calcio en agua tratado térmicamente hasta 750°C.

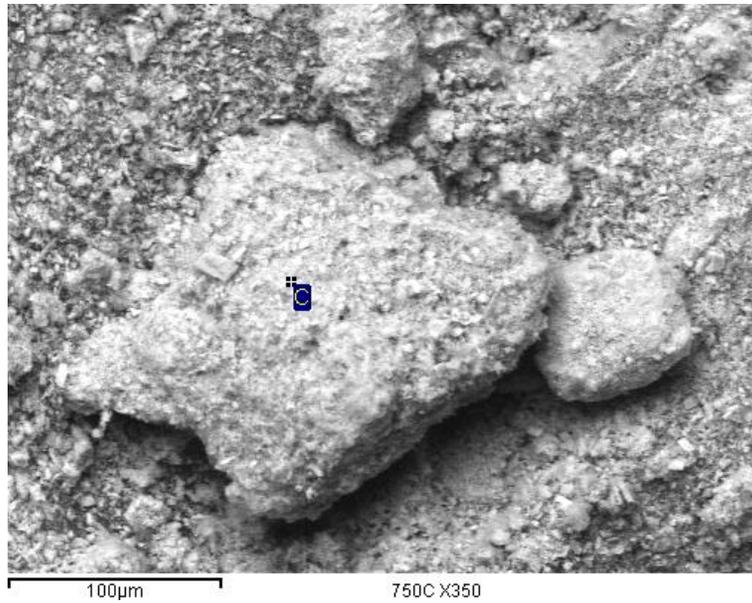


Figura 7. Micrografía de SEM de la hidroxiapatita estequiométrica producida a partir de fosfato de amonio y nitrato de calcio en agua tratado térmicamente hasta 750°C.

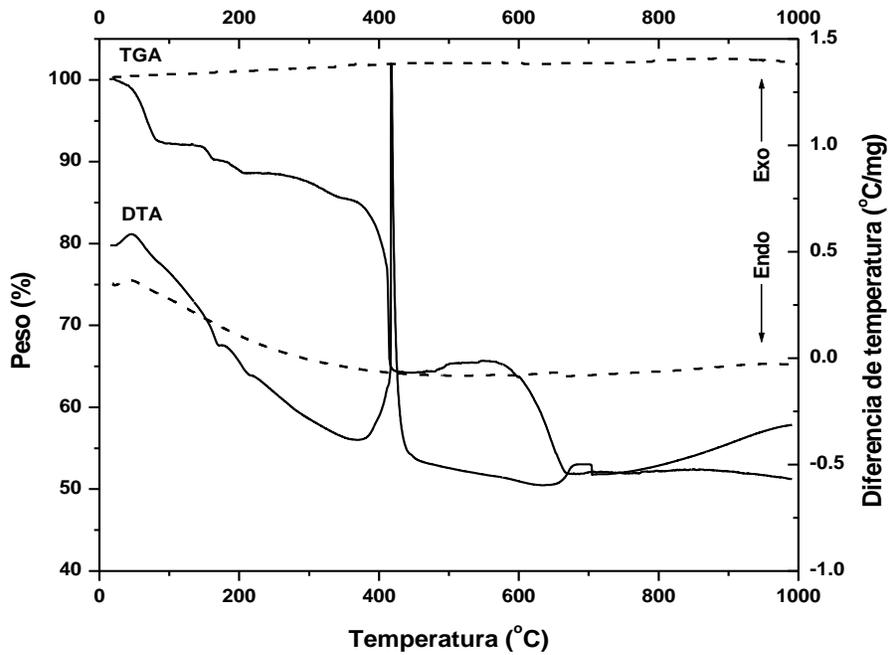
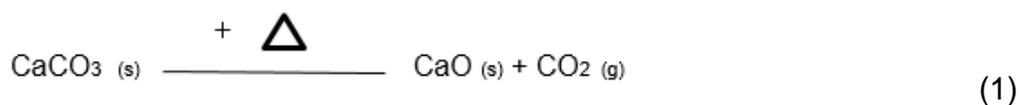


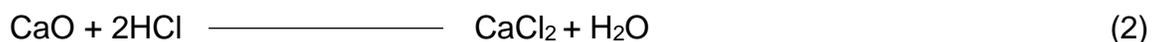
Figura 8. Curvas de análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA) del xerogel seco producido a partir de acetato de calcio y trietil fosfato en agua.

En el segundo proceso térmico, se observa una importante caída del porcentaje en peso acompañada de un pequeño pico endotérmico, mismo que puede deberse a la conversión de carbonato de calcio en óxido de calcio, liberando dióxido de carbono en forma de gas como se indica en la siguiente reacción.



4.2.2. Difracción de rayos-X

La Figura 9 muestra los patrones de difracción de rayos-X para el xerogel seco producido a partir del acetato de calcio y trietil fosfato en agua tratado térmicamente hasta 1000 °C. En esta figura se puede apreciar inmediatamente los patrones de difracción característicos del óxido de calcio (JCPDS 37-1497), producto de la descomposición del carbonato de calcio como se indicó en el análisis térmico. Por debajo y a muy baja intensidad con respecto al patrón del óxido de calcio se observa el patrón de difracción de la hidroxiapatita (JCPDS 09-432). Lo anterior indica que el producto final es hidroxiapatita acompañada de óxido de calcio. Para eliminar este óxido de calcio presente en el producto se procedió a practicar una serie de lavados ácidos con ácido clorhídrico .01 M para convertir el óxido de calcio producido en la ecuación (1) a cloruro de calcio como lo muestra la ecuación (2).



Aprovechando la alta solubilidad del cloruro de calcio en agua se procedió a practicar una serie de lavados con agua destilada para la obtención final de la hidroxiapatita como fase única el resultado de esto se muestra en la Figura 10.

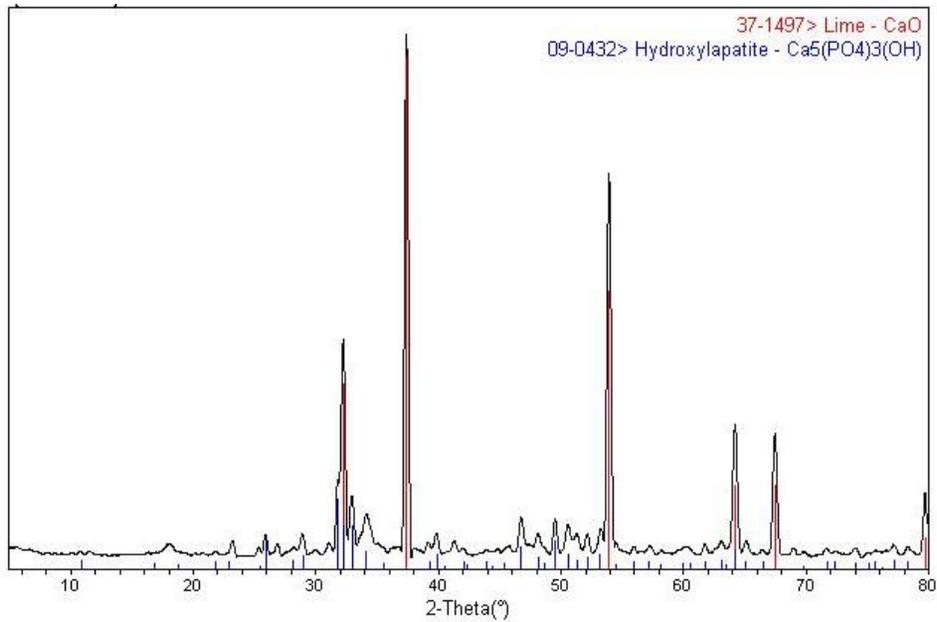


Figura 9. Patrones de difracción de rayos-X del xerogel seco producido a partir de acetato de calcio y trietil fosfato en agua tratado térmicamente hasta 1000°C.

La Figura 10 muestra que después de los lavados con HCl 0.01M y agua destilada el xerogel seco producido a partir de acetato de calcio y trietil fosfato en agua se convirtió totalmente en hidroxapatita como producto final. Sin embargo, si observamos detenidamente este patrón de difracción de rayos-X en $2\theta = 29.2^\circ$ se observa un pequeño pico correspondiente al patrón de difracción del carbonato.

Por otro lado, planos (211) y (112) del patrón de difracción de la hidroxapatita observamos que estos aparecen ligeramente traslapados. De la precisión anterior se concluye que la hidroxapatita obtenida es una hidroxapatita carbonatada donde los iones carbonatos penetraron a la celda unitaria de la hidroxapatita produciendo que las familias de planos estándar se recorrieran modificando sus distancias interplanares.

Como se sabe la hidroxapatita carbonatada puede ser de dos tipos hidroxapatita carbonatada del tipo A donde los iones carbonatos desplazan a iones OH mientras la hidroxapatita del tipo B desplaza a iones fosfato. Sin embargo, la técnica de

difracción de rayos-X está limitada a indicarnos únicamente que la hidroxiapatita sintetizada es carbonatada, y no puede descifrar si será del tipo A o del tipo B para saberlo se recurrirá al espectro FT-IR de la Figura 11.

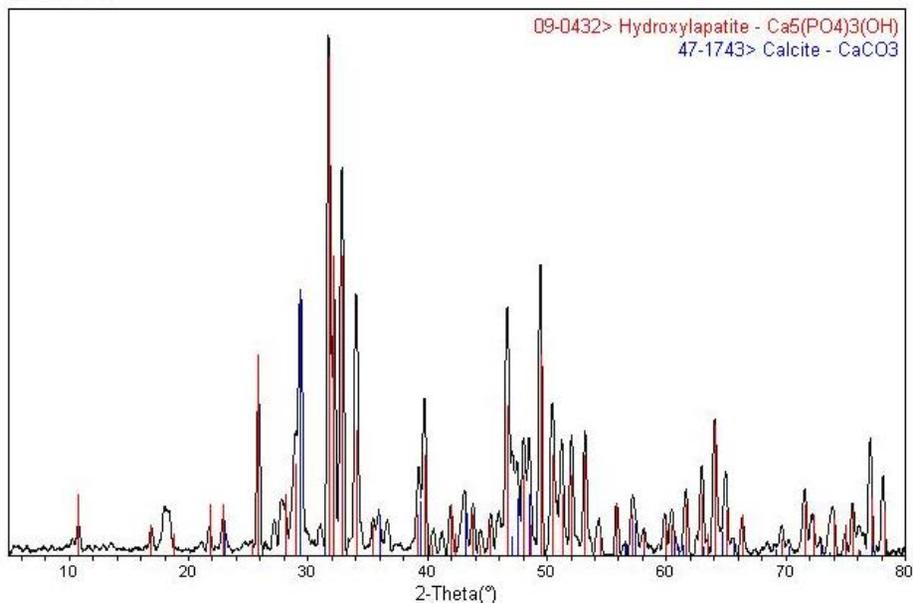


Figura 10. Patrones de difracción de rayos-X del xerogel seco producido a partir de acetato de calcio y trietil fosfato en agua tratado térmicamente hasta 1000°C, lavado con HCl 0.01M y agua destilada.

4.2.3 Espectroscopia infrarroja de transformadas de Fourier (FT-IR)

Al igual que en el espectro FT-IR de la hidroxiapatita en la Figura 6 la Figura 11 presenta también las bandas características para los ligandos O-H, P-O, pero además aparece una intensa banda alrededor de 1500 cm^{-1} correspondiente a la presencia de carbonato C-O. Esta banda en realidad corresponde a la integración de dos respuestas una a 1550 cm^{-1} y otra 1492 cm^{-1} , mismas que dan testimonio de la presencia de una carbonatación del tipo B en la hidroxiapatita. Si estas bandas aparecieran recorridas 50 cm^{-1} hacia la izquierda se tratará de una carbonatación del tipo A.

Por todo lo anterior se constata que la hidroxiapatita sintetizada por esta ruta es hidroxiapatita carbonatada del tipo B.

4.2.4. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

En la Figura 12 se muestra una micrografía de SEM de la hidroxiapatita carbonatada producida a partir de acetato de calcio y trietil fosfato en agua tratado térmicamente hasta 1000°C y lavada con HCl 0.01M y agua. En esta imagen se aprecia un material formado por partículas las cuales muestran cierta tendencia a aglomerarse de forma menos densa que la hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad, formando agregados que aparentemente presentan una superficie, la cual podría dar lugar a una mayor capacidad de permeo hacia el interior de sus estructuras, al ponerse en contacto con fluidos.

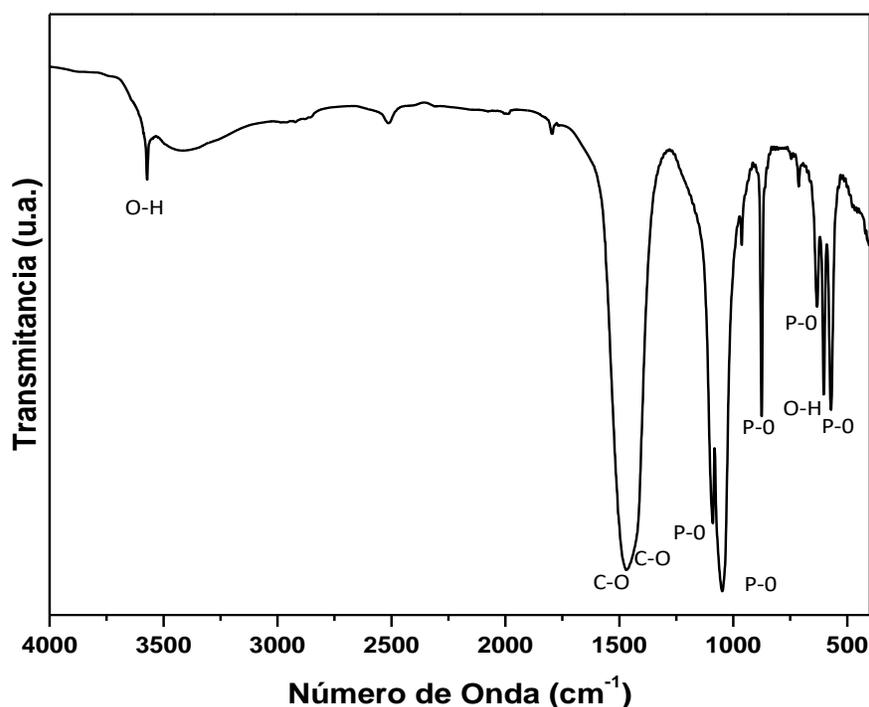


Figura 11. Espectro FT-IR del xerogel seco producido a partir de acetato de calcio y trietil fosfato en agua, tratado térmicamente a 1000°C lavado con HCl 0.01M y agua destilada.

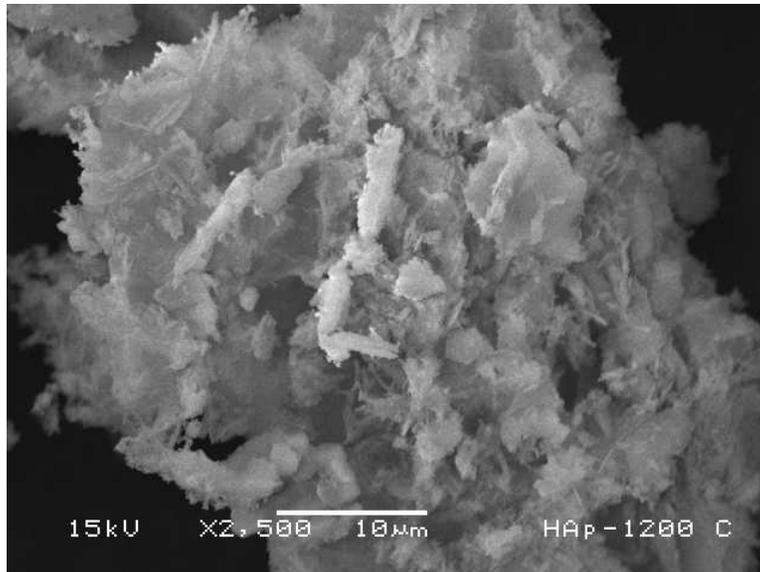


Figura 12. Micrografía de SEM de la hidroxiapatita carbonatada producida a partir de acetato de calcio y trietil fosfato en agua tratada térmicamente hasta 1000°C y lavada con HCl 0.01M y agua.

4.3. Evaluación de las Propiedades Bioactivas de los Biomateriales Compuestos de Hidroxiapatita Carbonatada/Hidroxiapatita Estequiometría de Alta Cristalinidad

4.3.1. Evaluación de la solubilidad

La solubilidad de los compósitos se evaluó analizando los cambios en concentración de los iones calcio (Ca), fósforo (P) y el pH de la solución, durante 1, 2 y 3 semanas. La Figura 13 muestra los gráficos de solubilidad de la hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad 100 HE expuesta al efecto de la solución fisiológica simulada durante 1, 2 y 3 semanas. En esta figura se aprecia un ligero aumento de la concentración de Ca por encima de 100 ppm, llegando a su estabilidad desde la segunda semana de reacción contrastando con la súbita disminución de fósforo desde los primeros días de reacción, prácticamente a niveles despreciables, mientras el pH se mantiene prácticamente constante. Lo anterior está de acuerdo con el mecanismo de bioactividad de la hidroxiapatita en la cual, en una primera etapa se empiezan a disolver los iones calcio y fósforo a partir de la fase mineral, lo que provoca una descompensación de la carga iónica de la solución SBF dando lugar a

una precipitación hacia la superficie de las partículas minerales de calcio y fosforo, preferencialmente de este último elemento dando lugar a la formación de una primera capa rica en fosforo seguidamente se lleva a cabo una precipitación de iones calcio simultáneamente con la disolución de estos a partir del mineral, si la precipitación es mayor que la disolución la curva de calcio tiende a bajar en las siguientes semanas, por otro lado si la disolución es mayor que la precipitación la curva de calcio tiende a subir en las próximas semanas. Para nuestro caso la curva se estabilizo a partir de la segunda semana. Lo cual indica que se presentó un equilibrio entre la precipitación y la disolución de calcio en la hidroxiapatita carbonatada. Esta capa formulada por calcio y fosforo finalmente cristaliza en la formación de apatita carbonatada biológica misma que es un indicativo de que el material es bioactivo.

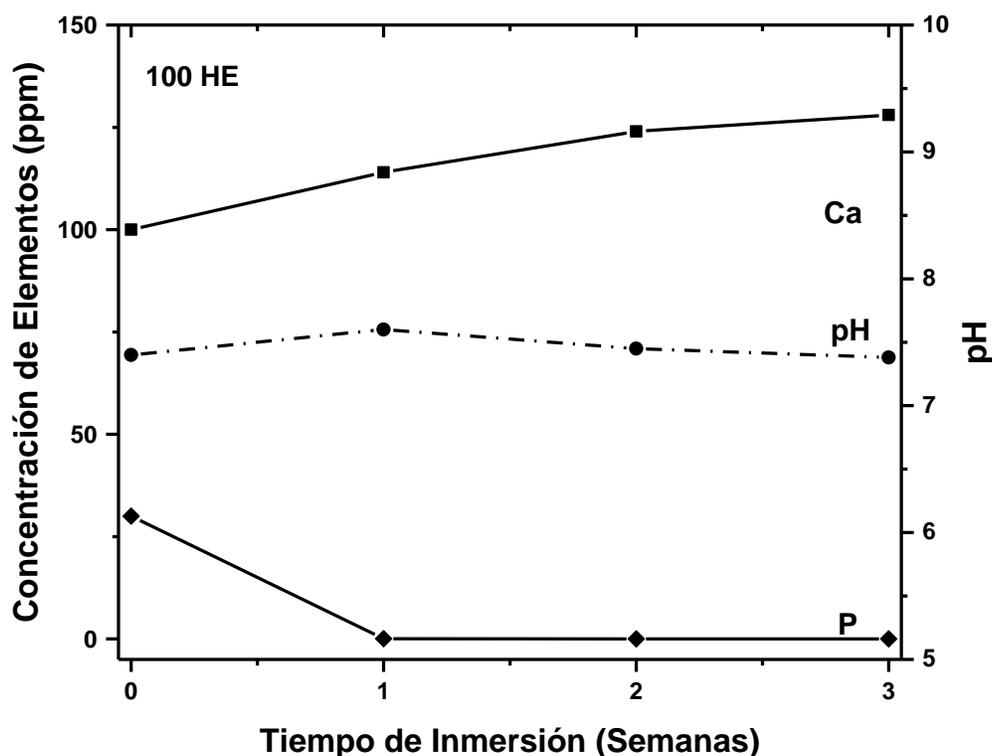


Figura 13. Curvas de pH y solubilidad de los iones Ca y P para 0.5 gramos de hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad sumergidos durante 3 semanas en la solución SBF.

La Figura 14 muestra los gráficos de solubilidad de la hidroxiapatita carbonatada 100 HC expuesta al efecto de la solución fisiológica simulada durante 1, 2 y 3

semanas. En contraste con el comportamiento de la Figura 13, en esta figura se aprecia un aumento significativo del pH, lo cual está relacionado con una mayor solubilidad de los componentes de este compósito, El calcio disuelto alcanza valores de aproximadamente 400 ppm durante las primeras 2 semanas, y decae ligeramente a la tercera semana. Lo anterior pone de manifiesto de que a pesar de que se consume calcio para la formación de la nueva capa de hidroxiapatita, la disolución es mayor que la precipitación. Por lo que corresponde al comportamiento del fósforo, este es semejante al observado en el material anterior, comportamiento típico de la formación de capas de apatita neoformadas, sobre las superficies de los materiales. Con este análisis se determina que la hidroxiapatita carbonatada es más soluble que la hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad, y por lo tanto más bioactiva.

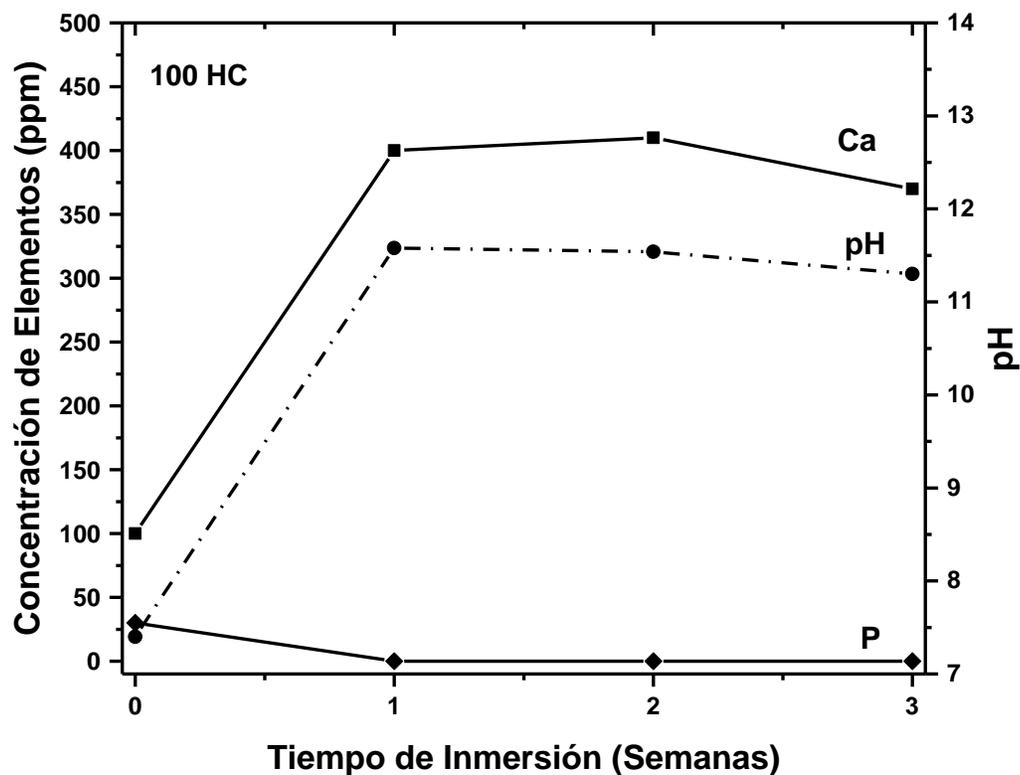


Figura 14. Curvas de pH y solubilidad de los iones Ca y P para 0.5 gramos de hidroxiapatita carbonatada sumergidos durante 3 semanas en la solución SBF. La Figura 15 muestra los gráficos de solubilidad del compósito formulado con 20% hidroxiapatita carbonatada/ 80% hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad 20 HC

– 80 HE expuesta al efecto de la solución fisiológica simulada durante 1, 2 y 3 semanas. En esta figura se observa un efecto de solubilidad combinado de ambos materiales, lo cual provoca una sinergia al colocar 20% de hidroxiapatita carbonatada al resto de la hidroxiapatita estequiométrica, se obtienen resultados superiores a los obtenidos con los materiales individuales. Por lo que corresponde al pH, se alcanzan valores por arriba de 12, manteniéndose constante a partir de la segunda semana; asimismo, los valores de solubilidad de calcio alcanzan valores superiores a los de los materiales base, los cuales decaen ligeramente a partir de la primera semana. El fósforo se manifiesta con un comportamiento similar al explicado en las dos figuras anteriores.

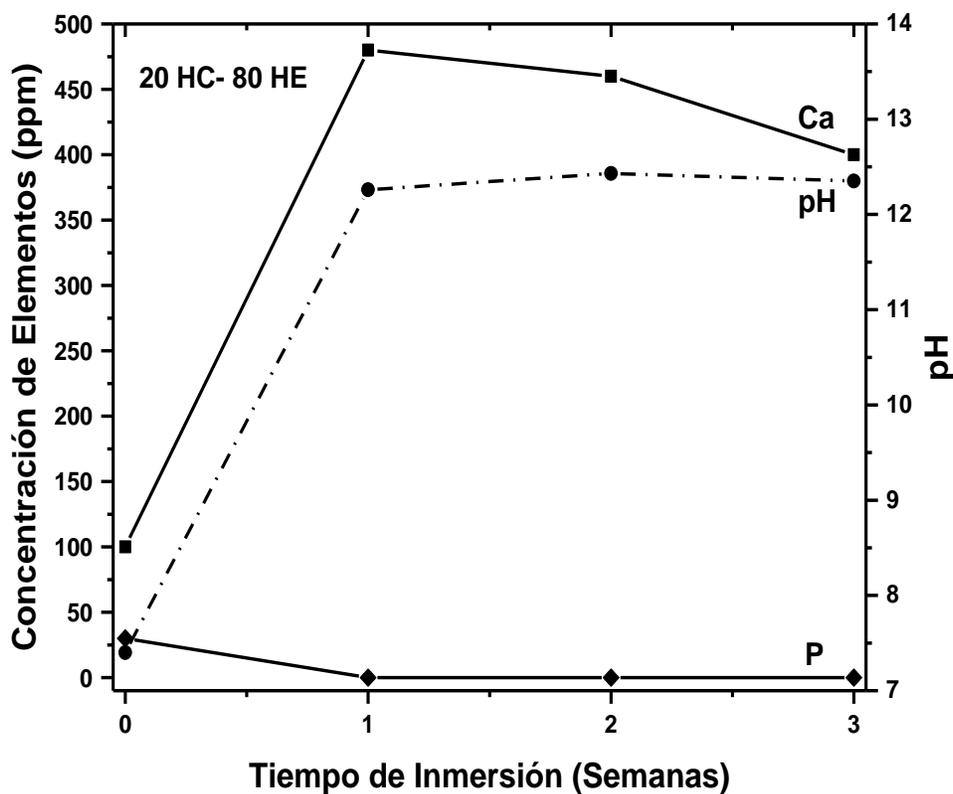


Figura 15. Curvas de pH y solubilidad de los iones Ca y P para 0.5 gramos del compuesto formulado con 20% hidroxiapatita carbonatada/ 80% hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad sumergidos durante 3 semanas en la solución SBF.

La Figura 16 muestra los gráficos de solubilidad del compuesto formulado con 50% hidroxiapatita carbonatada/ 50% hidroxiapatita estequiometrica de alta cristalinidad 50 HC – 50 HE expuesta al efecto de la solución fisiológica simulada durante 1, 2 y 3 semanas. Sistemáticamente, la adición de hidroxiapatita carbonatada al compuesto, potencia la solubilidad de los mismos, y por ende su bioactividad, como se parecía en esta figura, el pH alcanza valores por arriba de 12 y se mantiene constante a partir de la segunda semana; asimismo, la concentración de iones calcio en el sistema, tiene el mismo comportamiento descrito en la Figura 15, pero sus valores son superiores, producto de un efecto de disolución mayor, lo cual se reflejará en capas de apatita neoformada más gruesas y mejor distribuidas. La disminución abrupta de fosforo al igual que en los casos anteriores, da lugar a la formación de estas capas desde los primeros días de la inmersión en la solución SBF.

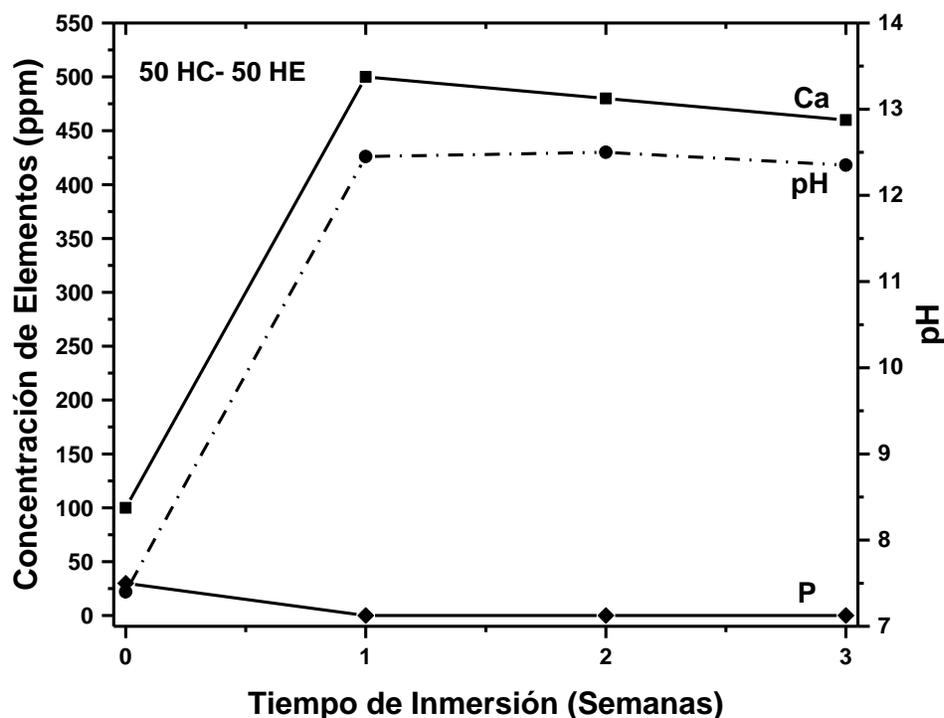


Figura 16. Curvas de pH y solubilidad de los iones Ca y P para 0.5 gramos del compuesto formulado con 50% hidroxiapatita carbonatada/50% hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad sumergidos durante 3 semanas en la solución SBF.

La Figura 17 muestra los gráficos de solubilidad del compuesto formulado con 20% hidroxiapatita carbonatada/ 80% hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad 80 HC – 20 HE expuesta al efecto de la solución fisiológica simulada durante 1, 2 y 3 semanas. En esta figura se constata que efectivamente, al seguir añadiendo hidroxiapatita carbonatada, en presencia de hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad, se potencia la solubilidad de los materiales, y con ello su bioactividad. En esta figura se parecía que los valores de pH y concentración de iones calcio es la más alta de los 5 casos estudiados. Asimismo, el comportamiento de los iones fósforo, está de acuerdo con el comportamiento de un material que produce capas neoformadas de apatita desde los primeros días de su inmersión en la solución SBF.

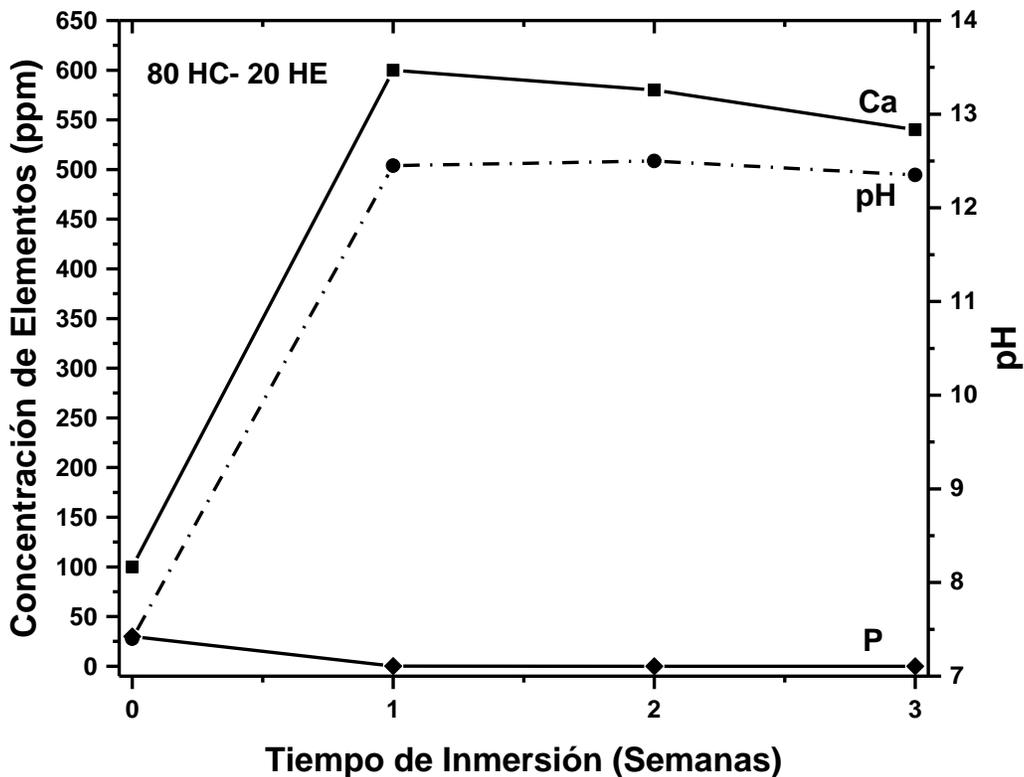


Figura 17. Curvas de pH y solubilidad de los iones Ca y P para 0.5 gramos del compuesto formulado con 80% hidroxiapatita carbonatada/20% hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad sumergidos durante 3 semanas en la solución SBF.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

A partir del presente estudio se desprenden las siguientes conclusiones:

- Se logró sintetizar hidroxiapatita estequiométrica en sus primeras etapas de cristalización, mediante una técnica sol-gel utilizando nitrato de calcio y fosfato de amonio como agentes precursores, tratando térmicamente el xerogel una temperatura relativamente baja de 350°C. Sin embargo, al tratarlo térmicamente hasta 750°C, la hidroxiapatita estequiométrica resultó de alta cristalinidad, como lo demostraron los análisis de DRX. Asimismo, tanto los análisis de DRX como de FT-IR demostraron que este material cuenta con la presencia de hidroxiapatita estequiométrica como fase única.
- Se logró sintetizar hidroxiapatita carbonatada del tipo "B" mediante una técnica sol-gel utilizando acetato de calcio y trietil fosfato como agentes precursores, llevando el el xerogel hasta 1000°C y purificándolo en repetidos lavados con HCl diluido y agua. Tanto los análisis de DRX como de FT-IR demostraron que este material cuenta con la presencia de hidroxiapatita carbonatada del tipo "B" sin la presencia de otros contaminantes, tales como carbonato de calcio, óxido de calcio, entre otros.
- Se formularon mediante mezcla directa, biocompósitos con ambos tipos de hidroxiapatitas, (hidroxiapatita carbonatada "HC" e hidroxiapatita estequiométrica "HE) en proporciones 100% HE, 20% HC/80% HE, 50% HC/50% HE, 80% HC/20% HE y 100% HC, resultado la hidroxiapatita carbonatada como la fase más soluble y la hidroxiapatita estequiométrica de alta cristalinidad como la menos soluble. Asimismo, la presencia de una mayor proporción de hidroxiapatita carbonatada en los materiales, propició una mayor solubilidad de los iones Ca y P, hacia la solución fisiológica, dando lugar a comportamientos bioactivos más eficientes.
- Con lo anterior, se está en la posibilidad de producir biomateriales compuestos de hidroxiapatita, en los cuales se puede modular el grado de

solubilidad de los mismos, y con ello su bioactividad, con lo cual se producirán biomateriales con características bioactivas, semejantes a las de los tejidos dañados que replazarán.

5.2. Recomendaciones

Para complementar este estudio se recomiendan las siguientes líneas de investigación:

- Sinterizar los polvos de los biocompuestos de hidroxiapatita producidos en este estudio, para obtener materiales densos con formas geométricas preestablecidas, con el fin de evaluar sus propiedades bioactivas; asimismo, correlacionar esta respuesta con un análisis paralelo de las propiedades mecánicas de estos materiales sinterizados.
- Soportar los polvos de los biocompuestos de hidroxiapatita producidos en este estudio, en biopelículas de materiales biodegradables con el fin de que funcionen como un andamiaje mientras el tejido óseo se restablece.
- Iniciar con el estudio de las propiedades biológicas de los materiales, mediante el desarrollo de análisis tales como pruebas de hemólisis y cultivos celulares, entre otros, los cuales permitirán conocer su grado de biocompatibilidad, al ser implantados en el interior de organismos vivos.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hench L.L., "Bioceramics: From Concept to Clinic," *Journal of the American Ceramic Society*; 74 [7] 1487-1510 (1991).
- [2] M.J. Olszta, X. Cheng, S.S. Jee, R. Kumar, Y. Kim, M.J. Kaufman, E. Douglas, and L.B.Gower, "Bone Structure and Formation: A New Perspective," *Materials Science & Engineering R*, 58 [3] 77-116 (2007).
- [3] Ratner, B. and Hoffman, A. "Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine". Academic Press. p.1996. 473.
- [4] Harry B. Skinner "Diagnóstico y Tratamiento en Ortopedia. Manual Moderno", 2da edición, México D.F. 2004
- [5] R. Petit, "The Use of Hydroxyapatite in Orthopaedic Surgery: A Ten-Year Review," *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.*, 9 71-74 (1999).
- [6] M.A. Encinas. Síntesis y caracterización de Compósitos de Hidroxiapatita-Wollastonita, Preparados Mediante la Técnica Sol-Gel, Tesis Doctoral Universidad de Sonora, 2009.
- [7] Encinas-Romero M.A., Aguayo-Salinas S., Castillo S.J., Castellón-Barraza F.F., and Castaño V.M., "Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Wollastonite Composite Powders by Sol-Gel Processing," *Int J. Appl. Ceram. Technol.*, 5 [4] 401–411 (2008).
- [8] M.A. Encinas, S. Aguayo, F.F. Castellón. Biomateriales Cerámicos: Una alternativa práctica en lesiones del tejido óseo, *Epistemus* 2:5-9 (2007).
- [9] W. Suchanek and M. Yoshimura, "Processing and Properties of Hydroxyapatite Based Biomaterials for Use as Hard Tissue Replacement Implants," *J. Mater. Res.*, 13 [1] 94-117 (1998).
- [10] W. Suchanek and M. Yoshimura, "Processing and Properties of Hydroxyapatite Based Biomaterials for Use as Hard Tissue Replacement Implants," *J. Mater. Res.*, 13 [1] 94-117 (1998).
- [11] L.C. Chow, "Solubility of Calcium Phosphates," *Octacalcium Phosphate Monogr. Oral Sci.*, eds. L.C. Chow and E.D. Eanes. Basel, Karger 18 94-111(2001).

- [12] Putlayev, Valery. "Calcium Phosphates". Departamento de Química de la Universidad de Moscú. www.hsms.msu.ru/pdf/bio-dresden.ppt. Página consultada en marzo de 2005.
- [13] González R., Blardoni F., Maestre H., Pereda O., Pancorbo E., Cienaga M. Long-terms results of the Coralline Porous Hydroxyapatite HAP-200 as bone implant's biomaterial in Orthopedics and Traumatology *Revista Ciencias Biológicas CENIC*, 2001.
- [14] Gimeno M. "Sustitutitos Óseos en Fracturas de Radio Distal". *Patología Aparato locomotor*. 5 (S2): 82-90, 2007
- [15] Angermann P: "Commercially Available Substitutes for Transplants of Human Bone". *Ugeskr-laeger*. 154(6): 333-6, 1992
- [16] Boskey Adele L. "Amorphous Calcium Phosphate: The Contention of Bone". *Journal of Dental Research*; Houston; Aug 1997. Vol. 76 No 8 p. 1433-1439.
- [17] R.Z LeGeros and J.P. LeGerosDecheyne, "Dense Hydroxyapatite," An Introduction to Bioceramics. eds., L.L. Hench and J. Wilson. World Scientific, Singapore. 139–180, 1993.
- [18] A Balamurugan, J. Michel, J. Fauré, H. Benhayoune, L. Wortham, G. Sockalingum, V. Banchet, S. Bouthors, D. Laurent-Maquin, and G. Balossier, "Synthesis and Structural Analysis of Sol gel Derived Stoichiometric Monophasic Hydroxyapatite," *Ceramics-Silikáty*, 50 [1] 27-31 (2006).
- [19] C. J. Brinker, G. W. Scherer. *Sol-gel Science -The Physics and Chemistry of Sol-gel Processing*. New York, Academic Press, 1990.
- [20] L.L Hench, "Sol-Gel Material for Bioceramics applications. Current Opinion," *Solid State Materials Science*, 2 604-606 (1997).
- [21] Jillavenkatesa A., Hoelzer D. T., and Condrate R. A., "An Electron Microscopy Study of the Formation of Hydroxyapatite Through Sol-Gel Processing," *J. Mater. Sci.*, 34 4821–4830 (1999).
- [22] Jillavenkatesa A., and Condrate R.A., "Sol-Gel Processing of Hydroxyapatite," *Journal of Materials Science*, 33 4111-4119 (1998).

- [23] U. Vijayalakshmi and S. Rajeswari, "Preparation and Characterization of Microcrystalline Hydroxyapatite Using Sol-Gel Method," *Trends Biomater. Artif. Organs*, 19 [2] 57-52 (2006).
- [24] U. Vijayalakshmi and S. Rajeswari, "Preparation and Characterization of Microcrystalline Hydroxyapatite Using Sol-Gel Method," *Trends Biomater. Artif. Organs*, 19 [2] 57-52 (2006).
- [25] T. Kokubo, H.Takadama. How useful is SBF in Predicting in Vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27 (2006), 2097-2915.