

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE FÓSFORO SOBRE LA MORFOLOGÍA Y
REACTIVIDAD QUÍMICA *IN VITRO* DE LA HIDROXIAPATITA DE ORIGEN
BOVINO**

EDUARD LEANDRO HERNÁNDEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA METALÚRGICA Y CIENCIA DE MATERIALES
BUCARAMANGA**

2019

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE FÓSFORO SOBRE LA MORFOLOGÍA Y
REACTIVIDAD QUÍMICA IN VITRO DE LA HIDROXIAPATITA DE ORIGEN
BOVINO.**

EDUARD LEANDRO HERNÁNDEZ

**Trabajo de grado de investigación para optar el título de Ingeniero
Metalúrgico**

Director

ANA EMILSE COY ECHEVERRÍA

Dr. en Ciencia y Tecnología de Materiales

Codirectores

FERNANDO VIEJO ESCALANTE

PhD. en Corrosión y Protección de Materiales Metálicos

DIEGO FERNANDO HERNÁNDEZ PARDO

MSc. en Ingeniería de Materiales

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA METALÚRGICA Y CIENCIA DE MATERIALES
BUCARAMANGA**

2019

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios por guiar mis pasos a lo largo de este camino, por darme la fortaleza para superar cada uno de los obstáculos y por permitirme terminar una etapa más en mi vida.

A mí madre, Sandra Hernández, por todo su amor y apoyo incondicional a lo largo de mi vida, por creer en mis sueños y ofrecer una mano para poder alcanzarlos y principalmente por acompañarme en los momentos de mayor adversidad y darme tantos consejos que me han formado como persona y profesional. Te amo.

A mí familia, en especial a mis hermanos, mis tíos, mis primas y mi nona, quienes con su ayuda, cariño y comprensión han sido parte fundamental de mi vida.

A mis amigos de corazón que durante todo el tiempo de formación han sabido apoyarme para continuar y no renunciar, y a mis amigos de la empresa Divertitys por ser la fuente de diversión y apoyo para poder superarme y salir adelante.

A todos mis compañeros y profesores de la universidad que de una u otra manera contribuyeron a mi formación personal y profesional.

Eduard Leandro Hernández

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primordialmente a Dios, por guiar cada uno de mis pasos, por darme la fortaleza para superar las adversidades y permitirme culminar satisfactoriamente mi carrera universitaria.

A la Universidad Industrial de Santander (UIS), por abrirme las puertas al conocimiento, por todos los años de aprendizaje brindados y por proporcionarme una excelente formación profesional.

A COLCIENCIAS por el apoyo constante a la ciencia en el país y por el patrocinio específico en este proyecto de investigación.

Al Profesor Diego Fernando Hernández Pardo el cual como codirector de proyecto y amigo siempre me ofreció su apoyo y conocimiento para poder culminar este trabajo.

A la Profesora Ana Emilse Coy Echeverria la cual, como directora de proyecto, siempre estuvo disponible para todas mis dudas y me dio parte de su tiempo para culminar este trabajo.

Al Profesor Fernando Alonso Viejo el cual como codirector aportó su experiencia, su disposición y orientación en la realización de la investigación, además de permitirme sus instalaciones para la realización de este proyecto.

A mis amigos y compañeros de carrera, que hicieron de mi paso por la universidad una experiencia inolvidable, en especial a Kelly Barbosa, Lyuba Lozano, Julián

Quintero, Diego Pacheco, Lina Sánchez, Jerzon Peña, Julián Grimaldos, Fabian Barbosa y Santiago Peña.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	17
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVO GENERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3. METODOLOGÍA	23
3.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE HIDROXIAPATITA OBTENIDA A PARTIR DE HUESO BOVINO (HAB).....	23
3.1.1 Remoción de materia orgánica del hueso mediante tratamiento químico.....	23
3.1.2 Obtención de la hidroxiapatita de origen bovino mediante tratamiento térmico.	24
3.1.3 Caracterización de la hidroxiapatita obtenida a partir de hueso bovino.	24
3.2 MODIFICACIÓN QUÍMICA Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA HAB CON FÓSFORO.....	25
3.2.1 Modificación química de la HAB mediante la adición de fósforo.....	25
3.2.2. Caracterización estructural de la HAB con fósforo.....	26
3.3 EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y MORFOLÓGICA DE LA HAB ANTES Y DESPUÉS DE LA REACTIVIDAD EN SBF	26
4. RESULTADOS.....	28
4.1 EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA HIDROXIAPATITA OBTENIDA A PARTIR DE HUESO BOVINO (HAB).....	28
4.1.1 Caracterización química de la hidroxiapatita bovina (HAB) obtenida.....	29
4.1.2 Determinación de la relación molar Ca/P de la HAB.....	30
4.1.3 Determinación de la estructura cristalina por DRX.	32
4.2 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA HAB MODIFICADA CON	

FÓSFORO	34
4.2.1 Determinación de la estructura cristalina mediante DRX.	34
4.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y MORFOLÓGICA DE LA HAB ANTES Y DESPUÉS DEL ENSAYO DE REACTIVIDAD EN SBF	36
4.3.1 Determinación del contenido de calcio y fósforo presentes en la solución SBF	36
4.4 EFECTO DE LA ADICIÓN DE P SOBRE LA MORFOLOGÍA Y COMPOSICIÓN DE LA HAB	41
5. CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA.....	46

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama de flujo de las etapas de la investigación.	23
Figura 2. Etapas de remoción de materia orgánica del hueso.	24
Figura 3. Muestras de hueso bovino (HB) después de la limpieza química con NaOH y tratadas térmicamente a diferentes tiempos.	28
Figura 4. Análisis CHN del hueso bovino sin tratamiento químico ni térmico (a) y muestras tratadas térmicamente a 2, 4 y 8 h (b).....	30
Figura 5. Relación molar Ca/P de las muestras de HAB calcinadas a 700°C con diferentes tiempos de tratamiento térmico.	31
Figura 6. Patrones DRX de HAB tratada térmicamente a 700°C con 2h de sostenimiento y de la HAS.	33
Figura 7. Refinamiento Rietveld de las muestras de HAB sin modificar (a), y modificadas: Ca/P: 1.2 (b) y Ca/P: 1.0 (c).....	35
Figura 8. Variación del calcio (a) y fósforo (b) en SBF para las relaciones de Ca/P evaluadas.	37
Figura 9. Espectros FTIR de las relaciones Ca/P 1.5 (a), 1.2 (b) y 1.0 (c) a cero y siete días de inmersión en SBF.	40
Figura 10. SEM y EDS de las relaciones Ca/P evaluadas a 0, 1 y 7 días de inmersión en SBF.	44

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Variación de la relación Ca/P de la HAB mediante la adición de TEF.	26
Tabla 2. Relación molar Ca/P calculada.	32
Tabla 3. Comparación de las características estructurales de las hidroxiapatita teórica, sintética y bovina obtenida a 700°C durante 2h.	33

RESUMEN

TÍTULO: EFECTO DE LA ADICIÓN DE FÓSFORO SOBRE LA MORFOLOGÍA Y REACTIVIDAD QUÍMICA *IN VITRO* DE LA HIDROXIAPATITA DE ORIGEN BOVINO*

Autor: Hernández, Eduard Leandro**

Palabras clave: hidroxiapatita bovina, modificación química, reactividad, SBF.

Descripción:

La hidroxiapatita obtenida de fuentes naturales como el hueso bovino se destaca de las obtenidas mediante el uso de precursores químicos, debido a que este es un material de gran interés en aplicaciones de regeneración ósea ya que tiene una importante similitud con la fase mineral del hueso humano además de su comportamiento biocompatible y bioactivo. La respuesta biológica de la hidroxiapatita bovina (HB) puede ser influenciada por la adición de diferentes iones que hacen parte constitutiva de su estructura química como es el Ca, P, Si, Zn, Sr, Si, etc., razón por la cual en esta investigación se estudió el efecto de la adición de P en la Hidroxiapatita Bovina mediante el análisis de la morfología y reactividad química *in vitro* en un fluido fisiológico simulado (SBF), teniendo en cuenta las relaciones molares Ca/P: 1.5, 1.2, y 1.0. Las muestras de Hidroxiapatita Bovina modificadas con P antes y después de los ensayos de reactividad fueron caracterizadas mediante Análisis químico elemental CHN, Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA), Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopía Transformada de Fourier (FTIR), Microscopía Electrónica de Barrido y Espectroscopía de Dispersión de Energía de Rayos X (SEM-EDS). Los resultados permitieron establecer que la adición de P a la Hidroxiapatita Bovina promueve la formación de una fase cristalina adicional a la hidroxiapatita denominada β -TCP que ralentiza la formación de apatitas en SBF.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de materiales.
Director: Ana Emilse Coy Echeverría. Codirector: Fernando Viejo y Diego Hernández Pardo

ABSTRACT

TITLE: EFFECT OF THE ADDITION OF PHOSPHORUS ON MORPHOLOGY AND IN VITRO CHEMICAL REACTIVITY OF BOVINE ORIGIN HYDROXYAPATITE*

Author: Hernández, Eduard Leandro**

Keywords: bovine hydroxyapatite, chemical modification, reactivity, SBF

Description:

Hydroxyapatite obtained from natural sources such as bovine bone stands out from those obtained through the use of chemical precursors, because this is a material of great interest in bone regeneration applications since it has an important similarity with the mineral phase of human bone also its addition to its biocompatible and bioactive behavior. The biological response of bovine hydroxyapatite (HB) can be influenced by the addition of different ions that are a constituent part of its chemical structure such as Ca, P, Si, Zn, Sr, Si, etc., which is why This investigation studied the effect of the addition of P on Bovine Hydroxyapatite by analyzing morphology and chemical reactivity in vitro in a simulated physiological fluid (SBF), taking into account the Ca / P molar ratios: 1.5, 1.2, and 1.0. The samples of Bovine Hydroxyapatite modified with P before and after the reactivity tests were characterized by CHN elementary chemical analysis, Atomic Absorption Spectroscopy (EAA), X-ray Diffraction (DRX), Fourier Transformed Spectroscopy (FTIR), Electron Microscopy Scanning and X-ray Energy Dispersion Spectroscopy (SEM-EDS). The results allowed to establish that the addition of P to Bovine Hydroxyapatite promotes the formation of an additional crystalline phase to the hydroxyapatite called β -TCP that slows the formation of apatites in SBF.

* Degree project

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de materiales.
Director: Ana Emilse Coy Echeverría. Codirector: Fernando Viejo y Diego Hernández Pardo

INTRODUCCIÓN

Dentro del campo de la regeneración ósea se utilizan comúnmente materiales que tengan similitud química con el hueso y que promuevan la formación de tejido óseo¹², razón por la cual la hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) es uno de los materiales más estudiados, dado que su relación Ca/P es muy cercana a la del hueso humano³. Diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que interacciona con los medios biológicos incentivando la aposición de células y la reestructuración ósea⁴⁵; sin embargo, problemas asociados a su baja reactividad en los medios biológicos han limitado su uso masivo como regenerador del hueso, ya que los tiempos de recuperación de los pacientes se hacen más extensos y la estabilidad mecánica del sitio receptor se ve comprometida⁶.

Las investigaciones realizadas al respecto han permitido demostrar que la fuente de obtención de la HA define en gran medida su respuesta en los medios biológicos⁷. En este sentido, la hidroxiapatita obtenida de una fuente natural como los huesos

¹ REALES G. and LOCHER A., "Biología del Tejido Óseo," Man. Implantol. Básica

² TRUJILLO D. M., ISABEL I. D., BRITO M., and RENÉ I. I., "Injertos óseos en implantología oral Bone grafts in oral implantology," Rev. Medica Electron., vol. 36, no. 4, pp. 449–461, 2014

³ SEQUEDA L. G., DÍAZ J. M., GUTIÉRREZ S. J., PERDOMO S. J., and GÓMEZ O. L., "Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo," Rev. Colomb. Ciencias Químico-Farmacéuticas, vol. 41, no. 1, pp. 50–66, 2012.

⁴ HORKAVCOVÁ D., ROHANOVA D., KUNCOVÁ L., ZITKOVÁ K., ZLÁMALOVÁ CÍLOVÁ Z., and HELEBRANT A., "Comparison of reactivity of synthetic and bovine hydroxyapatite in vitro under dynamic conditions," Ceram. - Silikaty, vol. 58, no. 1, pp. 70–78, 2014

⁵ ALLAIS M. et al., "Comparative study of bone regeneration in critical cranial bone defects using bone marrow adult stem cells and calcium phosphate," Rev. Esp. Cir. Oral y Maxilofac., vol. 37, no. 1, pp. 15–22, 2015

⁶ OKUDA T. et al., "The slow resorption with replacement by bone of a hydrothermally synthesized pure calcium-deficient hydroxyapatite," Biomaterials, vol. 29, no. 18, pp. 2719–2728, 2008.

⁷ RAHAVI S. S., GHADERI O., MONSHI A., and FATHI M. H., "A comparative study on physicochemical properties of hydroxyapatite powders derived from natural and synthetic sources," Russ. J. Non-Ferrous Met., vol. 58, no. 3, pp. 276–286, 2017.

bovinos (HAB) tiene una mayor reactividad⁸, mimetización del hueso receptor y menores costos de producción en comparación con las hidroxiapatitas obtenidas sintéticamente en laboratorio a partir de precursores químicos que contienen el P y Ca^{9 10 11 12}. Aun así, teniendo en cuenta las ventajas demostradas de la HAB, su reactividad sigue siendo baja en comparación a los procesos bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos óseos humanos^{13 14}. Las investigaciones en los últimos años con respecto a la HAB se han direccionado en modificar su reactividad mediante la combinación en diferentes proporciones con compuestos más reactivos como los biovidrios y fosfatos de calcio^{15 16 17 18 19} pero dificultades en la respuesta bioactiva del material final ha dejado en evidencia la falencia de esta ruta de modificación. La adición de elementos como el P, Si, Zn, Na, Mg, Sr, Co, entre otros,

⁸ ANJANEYULU U., PATTANAYAK D. K., and VIJAYALAKSHMI U., "Snail Shell Derived Natural Hydroxyapatite: Effects on NIH-3T3 Cells for Orthopedic Applications," *Mater. Manuf. Process.*, vol. 31, no. 2, pp. 206–216, 2016

⁹ AYATOLLAHI M. R., YAHYA M. Y., ASGHARZADEH SHIRAZI H., and HASSAN S. A., "Mechanical and tribological properties of hydroxyapatite nanoparticles extracted from natural bovine bone and the bone cement developed by nano-sized bovine hydroxyapatite filler," *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 9, pp. 10818–10827, 2015

¹⁰ TÉLLEZ JIMÉNEZ H., GUERRERO DEL ÁNGEL F., and TORRES BENITEZ J. M., "Estudio de hidroxiapatita natural vs sintética en su aceptación biológica y eficacia regenerativa ósea en modelo animal," *Rev. Oral*, no. 32, pp. 533–536, 2009

¹¹ KRISHNAMURITHY G., MURALI M. R., HAMDY M. ABBAS, A. A., RAGHAVENDRAN H. B., and KAMARUL T., "Characterization of bovine-derived porous hydroxyapatite scaffold and its potential to support osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells," *Ceram. Int.*, vol. 40, no. 1 PART A, pp. 771–777, 2014

¹² NIAKAN A. et al., "Sintering behaviour of natural porous hydroxyapatite derived from bovine bone," *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 2, pp. 3024–3029, 2015

¹³ BELLUCCI D., SOLA A., GAZZARRI M., CHIPELLINI F., and CANNILLO V., "A new hydroxyapatite-based biocomposite for bone replacement," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 3, pp. 1091–1101, 2013

¹⁴ CATTINI A., BELLUCCI D., SOLA A., PAWŁOWSKI L., and CANNILLO V., "Functional bioactive glass topcoats on hydroxyapatite coatings: Analysis of microstructure and in-vitro bioactivity," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 240, pp. 110–117, 2014

¹⁵ BELLUCCI D., SOLA A., GAZZARRI M., CHIPELLINI F., and CANNILLO V., *Op. Cit.*

¹⁶ CATTINI A., BELLUCCI D., SOLA A., PAWŁOWSKI L., and CANNILLO V., *Op. Cit.*

¹⁷ YAZDANPANA H. Z., BAHROLOLOOM M. E., and HASHEMI B., "Evaluating morphology and mechanical properties of glass-reinforced natural hydroxyapatite composites," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 41, pp. 36–42, 2015

¹⁸ CHAAR H., LABJAR H., and BRITEL O., "Synthèse du phosphate tricalcique-β," *Morphologie*, vol. 101, no. 334, pp. 120–124, 2017

¹⁹ GHOSH R. and SARKAR R., "Synthesis and characterization of sintered beta- tricalcium phosphate: A comparative study on the effect of preparation route," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 67, pp. 345–352, 2016

que son parte constitutiva del hueso humano^{20 21 22 23 24 25}, es una alternativa que podría mejorar la respuesta reactiva de la HAB dado que esta opción ha sido explorada en las hidroxiapatitas sintéticas (HAS); donde estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado la mejora en la respuesta biológica^{26 27}.

La adición de P (a la hidroxiapatita sintética) ha llamado la atención debido a que se puede obtener una hidroxiapatita con menor relación molar Ca/P y cristalinidad que la estequiométrica (Ca/P:1.67), que facilita la interacción con los medios biológicos y el hueso receptor, lo cual permite la formación de hueso nuevo en menor tiempo y disminuyendo los tiempos de recuperación de la zona afectada²⁸. A partir de lo mencionado anteriormente, en esta investigación se planteó evaluar el efecto de la adicción de P en la cristalinidad, morfología y reactividad química de la hidroxiapatita bovina (HAB) modificada con P en un medio fisiológico simulado (SBF).

²⁰ KRAMER E., ITZKOWITZ E., and WEI M., "Synthesis and characterization of cobalt-substituted hydroxyapatite powders," *Ceram. Int.*, vol. 40, no. 8 PART B, pp. 13471–13480, 2014.

²¹ KHALIL K. A., "A new-developed nanostructured Mg/HAp nanocomposite by high frequency induction heat sintering process," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 7, no. 11, pp. 10698–10710, 2012

²² TIAN T., JIANG D., ZHANG J., and LIN Q., "Synthesis of Si-substituted hydroxyapatite by a wet mechanochemical method," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 28, no. 1, pp. 57–63, 2008

²³ KAYGILI O., KESER S., BULUT N., and ATES T., "Characterization of Mg-containing hydroxyapatites synthesized by combustion method," *Phys. B Condens. Matter*, vol. 537, no. 3, pp. 63–67, 2018

²⁴ HUTCHENS S. A., CAMPION C., ASSAD M., CHAGNON M., and HING K. A., "Efficacy of silicate-substituted calcium phosphate with enhanced strut porosity as a standalone bone graft substitute and autograft extender in an ovine distal femoral critical defect model," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–12, 2016

²⁵ FRASNELLI M. et al., "Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 71, pp. 653–662, 2017

²⁶ SCALERA F. et al., "Strategies to Improve Bioactivity of Hydroxyapatite Bone Scaffolds," *Key Eng. Mater.*, vol. 758, pp. 132–137, 2017

²⁷ GOTO T. and SASAKI K., "Effects of trace elements in fish bones on crystal characteristics of hydroxyapatite obtained by calcination," *Ceram. Int.*, vol. 40, no. 7 PART B, pp. 10777–10785, 2014

²⁸ MAVROPOULOS E., ROSSI A. M., DA ROCHA N. C. C., SOARES G. A., MOREIRA J. C., and MOURE G. T., "Dissolution of calcium-deficient hydroxyapatite synthesized at different conditions," *Mater. Charact.*, vol. 50, no. 2–3, pp. 203–207, 2003

1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

La hidroxiapatita ($\text{HA:Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) es un compuesto químico constituido de calcio y fósforo principalmente, que pertenece a los cerámicos de fosfato de calcio con una relación molar de Ca/P de 1.67 ²⁹27], siendo la fase cristalina más estable en medios fisiológicos, investigada y empleada en aplicaciones clínicas de regeneración ósea como reparación de defectos dentales y ortopédicos, material de recubrimiento de prótesis ortopédicas y reconstrucción maxilofacial ^{30 31 32} dada su similitud química con el componente inorgánico del hueso natural ^{33 34 35 36 37}.

Dada la importancia de la HA en los procesos de regeneración ósea, se han investigado diferentes formas de obtención, ya sea mediante el empleo de precursores químicos (hidroxiapatita sintética) o mediante el empleo de fuentes

²⁹ CAROLINA D. and COY L., "Obtención y caracterización de Obtaining and Characterization of Hydroxyapatite doped with," 2016

³⁰ GARCÍA-GARDUÑO J., REYES-GASGAY Margarita Victoria; "La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica," Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas, vol. 9, no. 2, pp. 90–95, 2006

³¹ LI L., ZHAO M., LI J., ZUO Y., ZOU Q., and LI Y., "Preparation and cell infiltration of lotus-type porous nano-hydroxyapatite/polyurethane scaffold for bone tissue regeneration," Mater. Lett., vol. 149, pp. 25–28, 2015

³² AGRAWAL K., SINGH G., PURI D., and PRAKASH S., "Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Powder by Sol-Gel Method for Biomedical Application," J. Miner. Mater. Charact. Eng., vol. 10, no. 08, pp. 727–734, 2011

³³ EL KAMARY Y. and MOUSSA R. M., Synthesis, Properties, and Applications of Hydroxyapatite. 2012

³⁴ MEJÍA-MARTÍNEZ E. E., MATAMOROS-VELOZA Z., YANAGISAWA K., RENDÓN-ÁNGELES, J. C. and MORENO-PÉREZ B., "Influence of temperature on hydrothermal hot-pressing of magnesium hydroxyapatite powder," Bol. la Soc. Esp. Ceram. y Vidr., vol. 57, no. 2, pp. 45–54, 2017

³⁵ GODOY-MONZON D., BUTTARO M., COMBA F., ZANOTTI G., PICCALUGA F., and NEIRA-BORRAJO I., "Resultados de un vástago con cobertura completa de hidroxiapatita con un seguimiento mínimo de 5 años," Rev. Esp. Cir. Ortop. Traumatol., vol. 61, no. 6, pp. 390–396, 2017

³⁶ SAKTHIVEL P. and RAGU A., "Synthesis and Characterization of Nano Hydroxyapatite with Polymer Matrix Nano Composite for Biomedical Applications," Int. J. Chem. Environ. Biol. Sci., vol. 3, no. 5, pp. 383–385, 2015

³⁷ LJUBIŠA Đ. et al., "Scanning Electron Microscopy Analysis of Changes of Hydroxyapatite/Poly-L-Lactide With Different Molecular Weight of Plla After Intraperitoneal Implantation," Acta Vet., vol. 6646017018, no. 616, pp. 234–244, 2016

naturales (hidroxiapatita natural). Para el caso de la hidroxiapatita sintética (HAS), se han empleado diferentes técnicas de síntesis en las que se encuentran: la precipitación química ³⁸, los tratamientos hidrotermales ³⁹ y la técnica sol-gel ⁴⁰, técnicas que involucran diferentes precursores de Ca y P de procedencia orgánica e inorgánica, que bajo variables como el pH, la temperatura de reacción de los precursores, la temperatura de sinterización y la presión permiten el control en gran medida de la composición, homogeneidad, tamaño de partícula y cristalinidad de la HAS final. Sin embargo, problemas relacionados con bajas velocidades de reacción en los medios biológicos, reducción de mimetización en el hueso anfitrión y altos costos de producción han encaminado la búsqueda de nuevas alternativas para su obtención ^{41 42}.

Una de las alternativas para la obtención de la hidroxiapatita ha sido el empleo de fuentes naturales como cáscaras de huevo ⁴³, corales ⁴⁴ o huesos de diferentes vertebrados como los porcinos ⁴⁵, caprinos y bovinos ⁴⁶, ya que se ha evidenciado

³⁸ ABIDI S. S. A. and MURTAZA Q., "Synthesis and characterization of nano- hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction," *J. Mater. Sci. Technol.*, vol. 30, no. 4, pp. 307–310, 2014

³⁹ KUŚNIERUK S., WOJNAROWICZ J., CHODARA A., CHUDOBA T., GIERLOTKA S., and LOJKOWSKI W., "Influence of hydrothermal synthesis parameters on the properties of hydroxyapatite nanoparticles," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 1, pp. 1586–1601, 2016

⁴⁰ TREDWIN C. J., YOUNG A. M., GEORGIU G., SHIN S. H., KIM H. W., and KNOWLES J. C., "Hydroxyapatite, fluor-hydroxyapatite and fluorapatite produced via the sol-gel method. Optimisation, characterisation and rheology," *Dent. Mater.*, vol. 29, no. 2, pp. 166–173, 2013

⁴¹ ZHANG Q., SCHMELZER E., GERLACH J. C., and NETTLESHIP I., "A microstructural study of the degradation and calcium release from hydroxyapatite-calcium oxide ceramics made by infiltration," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 73, pp. 684– 691, 2017

⁴² WANG D. G., CHEN C. Z., YANG X. X., MING X. C., and ZHANG W. L., "Effect of bioglass addition on the properties of HA/BG composite films fabricated by pulsed laser deposition," *Ceram. Int.*, vol. 44, no. 12, pp. 14528–14533, 2018

⁴³ AZIS Y., ADRIAN M., ALFARISI C. D., KHAIRAT, and SRI R. M., "Synthesis of hydroxyapatite nanoparticles from egg shells by sol-gel method," *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 345, no. 1, 2018

⁴⁴ NANDI S. K., KUNDU B., MUKHERJEE J., MAHATO A., DATTA S., and BALLA V. K., "Converted marine coral hydroxyapatite implants with growth factors: In vivo bone regeneration," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 49, pp. 816–823, 2015

⁴⁵ KRZESINSKA M. and MAJEWSKA J., "Physical properties of continuous matrix of porous natural hydroxyapatite related to the pyrolysis temperature of animal bones precursors," *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, vol. 116, pp. 202–214, 2015

⁴⁶ RAMESH S. et al., "Characterization of biogenic hydroxyapatite derived from animal bones for biomedical applications," *Ceram. Int.*, vol. 44, no. 9, pp. 10525–10530, 2018

que la hidroxiapatita obtenida de estas fuentes naturales (HAN) en comparación con la HAS, tienen una mejor osteoconducción y mayor facultad de mimetizar de mejor manera el hueso receptor debido a su procedencia biológica⁴⁷. Específicamente, la hidroxiapatita obtenida de hueso bovino (HAB) presenta ciertas ventajas con respecto a las demás, ya que diversos estudios han demostrado que la HAB al tener una relación molar de Ca/P muy cercana a la del hueso humano de 1.67, tiene mejor biocompatibilidad, bioactividad, y un comportamiento de mimetización más cercano a la del hueso receptor ⁴⁸; sin embargo, a pesar de las ventajas que tiene sobre la HAS, la HAB sigue teniendo baja reactividad en los medios biológicos, lo cual limita su aplicación en la regeneración ósea de huesos corticales.

Con el ánimo de superar el problema de baja reactividad que tiene la HAB, las investigaciones han establecido principalmente dos rutas. El primer camino se centra en hacer combinaciones de la hidroxiapatita con materiales que presentan mayor reactividad como son los fosfatos de calcio y los biovidrios ^{49 50}. El otro camino que ha despertado gran interés es la adición de elementos químicos o iones a la hidroxiapatita que son parte constitutiva de los huesos como el Mg, Si, Sr, Zn, PO₄³⁻, entre otros. Bajo estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que la incorporación de estos elementos dentro de la estructura de la hidroxiapatita mejora su interacción con los medios biológicos aumentando sus velocidades de reacción ^{51 52 53 54 55 56}. Vale aclarar en este punto, que los estudios de adición de elementos

⁴⁷ ANVARI-YAZDI A. F., YAZDANI A., TALAEI-KHOZANI T., and KALANTAR M., "Extraction and Viability Checking of Various Carbonated Hydroxyapatite by Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell," *Sci. Int.*, vol. 1, no. 5, pp. 132– 138, 2013

⁴⁸ RAMESH S. et al., *Op. Cit.*

⁴⁹ PEREZ GONZALEZ J. A., "Síntesis de biovidrios por la técnica sol-gel con incorporación de metales y estudio de sus propiedades antibacteriales," p. 63, 2012

⁵⁰ ŁĄCZKA M., CHOLEWA-KOWALSKA K., and OSYCZKA A. M., "Bioactivity and osteoinductivity of glasses and glassceramics and their material determinants," *Ceram. Int.*, vol. 42, no. 13, pp. 14313– 14325, 2016

⁵¹ KRAMER E., ITZKOWITZ E., and WEI M., *Op. Cit.*

⁵² KHALIL K. A., *Op. Cit.*

⁵³ TIAN T., JIANG D., ZHANG J., and LIN Q., *Op. Cit.*

⁵⁴ KAYGILI O., KESER S., BULUT N., and ATES T., *Op. Cit.*

⁵⁵ HUTCHENS S. A., CAMPION C., ASSAD M., CHAGNON M., and HING K. A., " *Op. Cit.*

⁵⁶ FRASNELLI M. et al., *Op. Cit.*

o iones a la hidroxiapatita se han centrado en las HAS y muy pocos estudios o ninguno se han reportado sobre las HAB y de forma genérica sobre la HAN, dejando un vacío en el estado del conocimiento, que hace pertinente este tipo de investigaciones ⁵⁷. La modificación química de la HAS particularmente con PO₄³⁻ ha despertado gran interés, ya que partiendo desde el punto de vista de que la HA contiene dos tipos de sitios de unión para las proteínas, una con carga positiva (Ca²⁺) y otra con carga negativa correspondiente al ion PO₄³⁻ ⁵⁸, se ha logrado demostrar en ensayos *in vitro* que este ion promueve la formación de una hidroxiapatita con menor grado de cristalinidad, mayor reactividad y reabsorción en los medios biológicos en comparación a la HAS estequiométrica y a la hidroxiapatita modificada con iones Ca²⁺ en las que se promueven la formación de otras fases cristalinas ⁵⁹.

Adicionalmente, algunos estudios han demostrado que aumentos controlados del ion fosfato (PO₄³⁻) dentro de la estructura de la hidroxiapatita generan cambios en su morfología los cuales afectan la deposición, formación y nucleación de las apatitas (biomineralización) en las superficie de la hidroxiapatita al estar en contacto con los fluidos fisiológicos⁶⁰51]. Una suposición del efecto del ion fosfato en la hidroxiapatita es que estos iones inorgánicos estabilizan selectivamente un conjunto

⁵⁷ MEJÍA-MARTÍNEZ E. E., MATAMOROS-VELOZA Z., YANAGISAWA K., RENDÓN- ÁNGELES J. C., and MORENO-PÉREZ B., "Influence of temperature on hydrothermal hot-pressing of magnesium hydroxyapatite powder," Bol. la Soc. Esp. Ceram. y Vidr., 2017

⁵⁸ BIANCO A., CACCIOTTI I., LOMBARDI M., and MONTANARO L., "Si-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sinterability," Mater. Res. Bull., vol. 44, no. 2, pp. 345–354, 2009

⁵⁹ SINKÓ K., MEISZTERICS A., ROHONCZY J., KOBZI B., and KUBUKI S., "Effect of phosphorus precursors on the structure of bioactive calcium phosphate silicate systems," Mater. Sci. Eng. C, vol. 73, pp. 767–777, 2017

⁶⁰ JIANG S. D., YAO Q. Z., MA Y. F., ZHOU G. T., and S. Q. Fu, "Phosphate- dependent morphological evolution of hydroxyapatite and implication for biomineralisation," Gondwana Res., vol. 28, no. 2, pp. 858–868, 2015

de caras del cristal de carbonato de calcio a través de su adsorción preferencial a estas caras, y por lo tanto influyen en el crecimiento del cristal ^{61 62}.

Para finalizar, la importancia de la modificación de la hidroxiapatita con el ion fosfato, se basa en que promueve la formación de una hidroxiapatita con alta biocompatibilidad y con una mayor capacidad de inducir enlaces químicos entre el implante y el hueso cortical, acelerando el proceso de osteointegración en comparación con la hidroxiapatita estequiométrica ⁶³54], lo cual se traduce en una mayor estabilidad del regenerador óseo en el hueso anfitrión y una disminución de los tiempos de recuperación de la zona afectada ⁶⁴, características que hacen al fósforo un elemento muy prometedor para ser usado como modificador de la hidroxiapatita y así contribuir al aumento de reactividad de ésta en los medios biológicos.

⁶¹ RAZ S., WEINER S., and ADDADI L., "Formation of high-magnesian calcites via an amorphous precursor phase: Possible biological implications," *Adv. Mater.*, vol. 12, no. 1, pp. 38–42, 2000

⁶² ADDADI L., RAZ S., and WEINER S., "Taking advantage of disorder: Amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization," *Adv. Mater.*, vol. 15, no. 12, pp. 959–970, 2003

⁶³ JIANG S. D., YAO Q. Z., MA Y. F., ZHOU G. T., and FU S. Q., "Phosphate- dependent morphological evolution of hydroxyapatite and implication for biomineralisation," *Gondwana Res.*, vol. 28, no. 2, pp. 858–868, 2015

⁶⁴ MAVROPOULOS E., ROSSI A. M., DA ROCHA N. C. C., SOARES G. A., MOREIRA J. C., and MOURE G. T., *Op. Cit.*

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la adición de fósforo sobre la morfología y reactividad química de la hidroxiapatita bovina (HAB) en un medio fisiológico simulado.

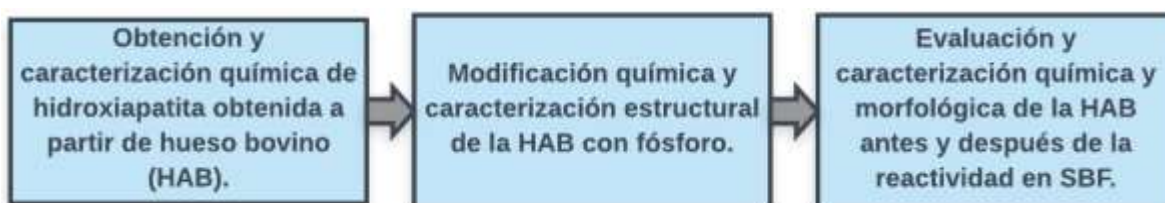
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener hidroxiapatita de alta pureza a partir de hueso bovino mediante el empleo de tratamientos térmicos y químicos.
- Establecer las variables de síntesis para la modificación química de la hidroxiapatita con el precursor de fósforo trietil fosfato (TIEF).
- Determinar el efecto de la adición de fósforo en la morfología de la hidroxiapatita bovina.
- Evaluar la reactividad química de la hidroxiapatita bovina modificada con fósforo en un medio fisiológico simulado.

3. METODOLOGÍA

El presente trabajo de investigación se desarrolló siguiendo las etapas indicadas en la Figura 1.

Figura 1. Diagrama de flujo de las etapas de la investigación.



3.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE HIDROXIAPATITA OBTENIDA A PARTIR DE HUESO BOVINO (HAB).

La obtención de la hidroxiapatita se realizó a partir de hueso cortical bovino, proveniente de una carnicería local, que fue seccionado en dimensiones aproximadas de 4 cm de longitud, para ser sometido inicialmente a un tratamiento químico con el objeto de extraer la mayor cantidad de materia orgánica y, posteriormente, mediante tratamiento térmico eliminar el remanente de materia orgánica y obtener la hidroxiapatita de alta pureza.

3.1.1 Remoción de materia orgánica del hueso mediante tratamiento químico.

En esta primera etapa se siguió un protocolo de limpieza que consistió en: 1) limpieza manual del tejido blando expuesto, 2) limpieza en agua destilada a

temperatura de ebullición y 3) limpieza química con NaOH ⁶⁵. En la Figura 2 se muestra el proceso detallado de cada una de las etapas realizadas.

Figura 2. Etapas de remoción de materia orgánica del hueso.



3.1.2 Obtención de la hidroxiapatita de origen bovino mediante tratamiento térmico. A partir del hueso tratado químicamente con NaOH, bajo el procedimiento mencionado anteriormente, se inició el tratamiento térmico del material desde temperatura ambiente hasta 700°C con una rampa de calentamiento de 10°C/min ⁶⁶, donde se evaluaron los tiempos de sostenimiento de 0, 2, 4 y 8 horas con el objetivo de establecer el tiempo más adecuado para la formación de la hidroxiapatita bovina de alta pureza. Las muestras tratadas fueron llevadas a conminución en un mortero de ágata hasta obtener tamaños de partícula menor a 75 µm, para posteriormente ser caracterizadas.

3.1.3 Caracterización de la hidroxiapatita obtenida a partir de hueso bovino.

Se procedió a caracterizar las muestras resultantes del tratamiento térmico mediante análisis elemental CHN (carbono, hidrógeno y nitrógeno) en el equipo de análisis elemental CHN marca Sundry modelo SDCHN 435, con el fin de determinar la eficiencia de los tratamiento químico y térmico en la eliminación del material orgánico del hueso. Para la realización del ensayo se tomó una muestra de 100 mg por cada condición.

⁶⁵ GE LIFE SCIENCES, "Use of sodium hydroxide for cleaning and sanitization of chromatography media and systems - Application note 18-1124-57 AI," no. 3, p. Process chromatography, 2014

⁶⁶ MATER J.. "The effect of cyclic heat treatment on the physicochemical properties of bio hydroxyapatite from bovine bone," Sci. Mater. Med., 2018

Por otro lado, se determinó el contenido de calcio por espectrometría de absorción atómica (AA) utilizando el equipo Agilent Technologies 200 Series AA, mientras que el contenido de fósforo fue hallado mediante el espectrofotómetro UV-Vis, marca analytikjena modelo Specord 210 plus. Para la realización de los ensayos fue necesaria la disolución de los polvos de las muestras en una solución de ácido nítrico durante una hora en agitación, donde se realizaron las determinaciones de Ca y P en muestras por triplicado.

3.2 MODIFICACIÓN QUÍMICA Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA HAB CON FÓSFORO

3.2.1 Modificación química de la HAB mediante la adición de fósforo. El proceso de modificación química de la HAB inicia con la disolución de ésta en ácido HNO₃ al 65%, durante tiempo aproximado de 2 horas, hasta que la solución resultante fue completamente traslucida; posteriormente, se procedió a la adición del trietil fosfato (TEF) como precursor de fósforo y se dejó bajo agitación durante 24 horas, para garantizar la completa homogenización de la muestra; luego de este tiempo, se realizó el proceso de evaporación del solvente a 100°C y el tratamiento térmico del material obtenido a 700°C durante el tiempo seleccionado del ítem anterior.

Las adiciones de TEF corresponden las relaciones molares Ca/P indicadas en la Tabla 1, teniendo en cuenta que la relación Ca/P de 1.5 hace referencia a la relación calculada para la HAB obtenida sin adición de fósforo, la cual es el punto de partida para la modificación de la HAB. Las relaciones molares Ca/P seleccionadas fueron

escogidas bajo revisión bibliográfica referenciada a la modificación de la hidroxiapatita sintética con fósforo ⁶⁷.

Tabla 1. Variación de la relación Ca/P de la HAB mediante la adición de TEF.

Relación Ca/P obtenida	Cantidad de precursor TEF añadida (µL) a 1g de muestra
1.5	0
1.2	228
1.0	461

3.2.2. Caracterización estructural de la HAB con fósforo. Las muestras obtenidas fueron caracterizadas mediante difracción de rayos X (DRX); el análisis cualitativo de las fases se realizó mediante la utilización de la base de datos QualX (software libre). Adicionalmente, con el objetivo de ver la influencia del fósforo sobre la cristalinidad de la HAB, se realizó el análisis estructural de las señales con el programa Match! 3 (software libre) que permitió emplear el método de RIETVELD como técnica de refinamiento.

3.3 EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y MORFOLÓGICA DE LA HAB ANTES Y DESPUÉS DE LA REACTIVIDAD EN SBF

Previo a los ensayos de reactividad, los polvos de las muestras correspondientes a las relaciones Ca/P:1.5, 1.2 y 1.0 fueron llevados a compactación en una prensa uniaxial a una fuerza de compresión de 30 kN. Posteriormente las pastillas obtenidas fueron sumergidas en un fluido corporal simulado (SBF) de *Kokubo* dada su similitud con la carga iónica del plasma humano ⁶⁸. La temperatura de realización

⁶⁷ JIANG S. D., YAO Q. Z., MA Y. F., ZHOU G. T., and FU S. Q., "Phosphate- dependent morphological evolution of hydroxyapatite and implication for biomineralisation," *Gondwana Res.*, vol. 28, no. 2, pp. 858–868, 2015

⁶⁸ ŁĄCZKA M., CHOLEWA-KOWALSKA K., and OSYCZKA A. M., Op. Cit.

de los ensayos de reactividad fue de $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, emulando las condiciones fisiológicas normales del cuerpo humano.

Se seleccionaron como tiempos de muestreo del SBF los días 1, 3, 5 y 7, en los cuales se tomaron las alícuotas para la determinación de Ca por las técnicas de espectroscopía de AA y P por espectroscopía de ultravioleta – visible (UV-VIS). Los cambios morfológicos y químicos sobre la superficie en las muestras inmersas en SBF, en los distintos tiempos, fueron evaluados mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM), y espectroscopia de dispersión de energía de rayos-x (EDS), utilizando el Microscopio Quanta FEG 650. La influencia de la adición del fósforo en la formación de los grupos funcionales de las moléculas que componen la hidroxiapatita se evaluó mediante la técnica de Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), en la cual se analizaron las pastillas obtenidas de las tres relaciones Ca/P evaluadas a los 0 y 7 días de inmersión en el fluido SBF.

4. RESULTADOS

4.1 EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA HIDROXIAPATITA OBTENIDA A PARTIR DE HUESO BOVINO (HAB)

En la Figura 3 se presentan las imágenes de las muestras de hueso bovino después de la limpieza química con NaOH y sometidas a 700°C bajo diferentes tiempos de tratamiento.

Figura 3. Muestras de hueso bovino (HB) después de la limpieza química con NaOH y tratadas térmicamente a diferentes tiempos.



Como se puede observar en la Figura 3, el material obtenido a las 0 horas de tratamiento térmico presenta una coloración oscura en diferentes zonas de la muestra, indicativo de la presencia de material orgánico en la muestra; no obstante, a medida que aumenta el tiempo de tratamiento, se observa que dicha coloración desaparece para dar muestras de una tonalidad totalmente blanca, hecho que permite inferir que el material final presenta porcentajes materia orgánica muy bajos. A partir de esta observación se descartó continuar con el estudio de la muestra tratada a 0h.

4.1.1 Caracterización química de la hidroxiapatita bovina (HAB) obtenida

- Análisis elemental carbono, hidrógeno y nitrógeno (CHN)

Los resultados del análisis CHN para las diferentes condiciones estudiadas se pueden observar en la Figura 4 (a y b). La figura 4(a) representa los porcentajes de C (12.38%), H (2.64%) y N (4.30%) que tiene el hueso bovino sin ningún tipo de tratamiento previo, los valores encontrados están en concordancia con los reportados en la literatura y permiten ser el blanco de comparación con las muestras a las diferentes condiciones de tratamiento ⁶⁹.

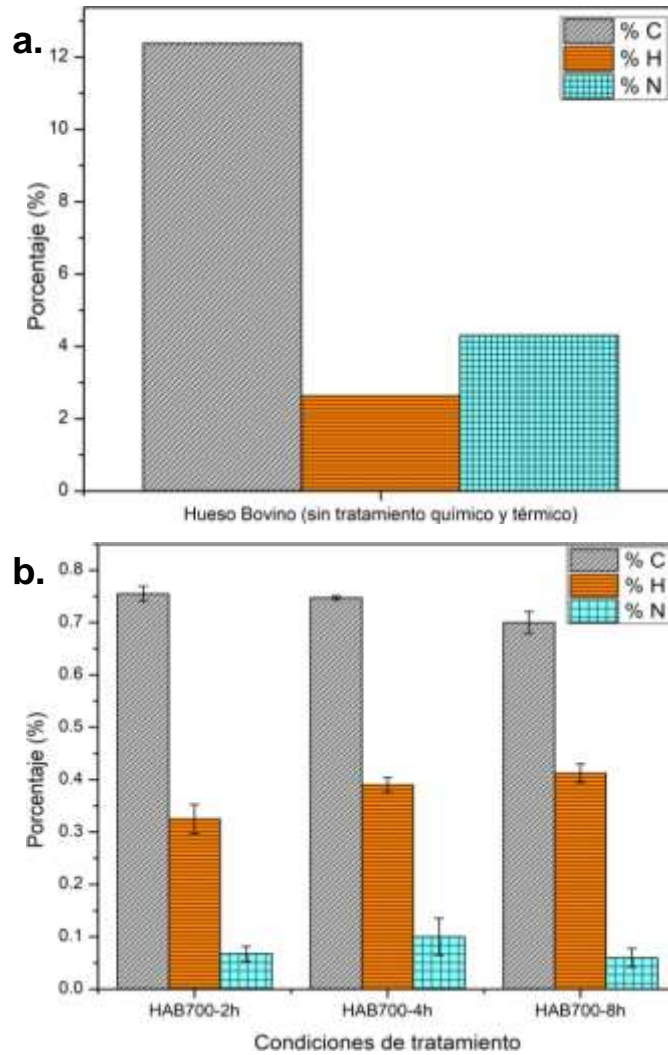
En la Figura 4(b) se muestran los resultados de las muestras a diferentes tiempos de tratamiento térmico, donde de manera general se puede observar la disminución sustancial de los porcentajes de carbono, nitrógeno e hidrogeno para todas las muestras por debajo del 1% por efecto tanto del tratamiento químico como del térmico al cual fueron sometidas las muestras. Adicional a eso se puede observar que existe una ligera tendencia en la variación de carbono e hidrógeno con el tiempo de tratamiento térmico; sin embargo, los valores son muy similares y se encuentran entre 0.70% y 0.75 % para el C y entre 0.30% y 0.40% para el H; el N, cuya presencia es menor, varió entre 0.06% y 0.1%. Las variaciones porcentuales para las muestras señaladas en la Figura 4(b) a partir de las barras de error, no representan estadísticamente una diferencia entre ellas y se puede inferir desde ese de punto de vista que no hay variaciones sustanciales de dichos elementos con el tiempo de tratamiento.

A partir del análisis realizado de los resultados CHN permiten establecer que los porcentajes de carga orgánica del material están bajo los límites permisibles

⁶⁹ KRZESIŃSKA M. and MAJEWSKA J., Op. Cit.

indicados en la norma ASTM F1581 – 08 ⁷⁰, por lo tanto un tiempo de tratamiento térmico de 2 h es suficiente para la remoción del remanente de materia orgánica, independiente de la fase cristalina formada.

Figura 4. Análisis CHN del hueso bovino sin tratamiento químico ni térmico (a) y muestras tratadas térmicamente a 2, 4 y 8 h (b).

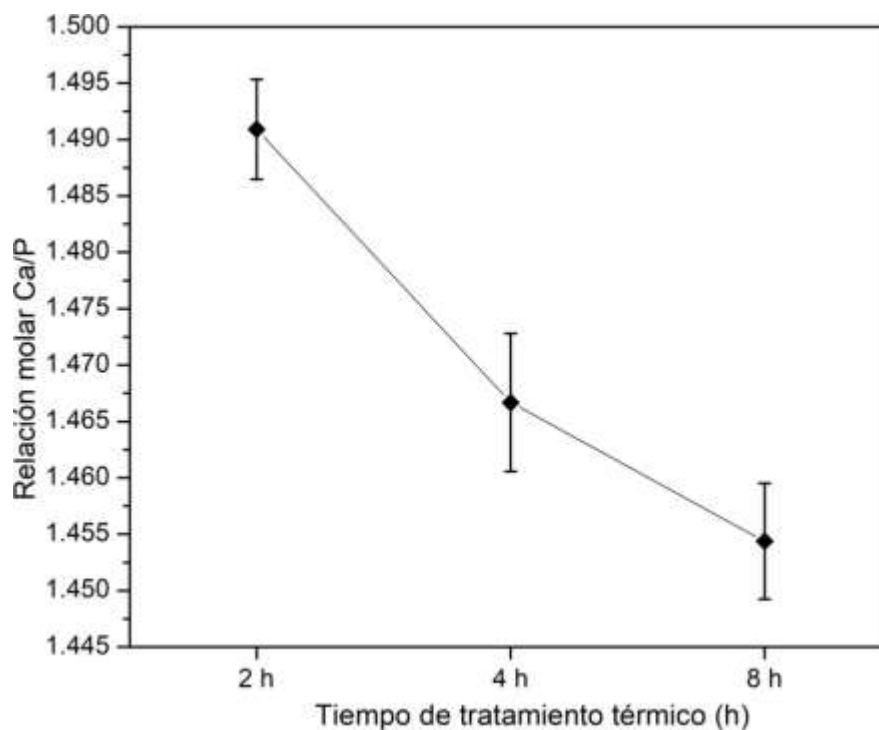


4.1.2 Determinación de la relación molar Ca/P de la HAB. En la Figura 5 se muestra la variación de la relación molar de Ca/P de las muestras obtenidas a

⁷⁰ DIOXIDE D. C. et al., "Standard Specification for Composition of Anorganic Bone for Surgical Implants 1," vol. 08, no. Reapproved 2016, pp. 8–11, 2019

diferentes tiempos de tratamiento. Se puede observar que dichas relaciones varían entre 1,49 y 1,45 y son menores que la relación teórica de la hidroxiapatita (Ca/P: 1,67)⁷¹. Además, se puede apreciar que ésta disminuye con el tiempo de sostenimiento, lo que se asocia con la disminución del Ca, el cual varió de 8.22 hasta 8.07 mmol, mientras que la variación de P fue muy pequeña, casi constante de 5.51 mmol a 5.55 mmol (Tabla 2).

Figura 5. Relación molar Ca/P de las muestras de HAB calcinadas a 700°C con diferentes tiempos de tratamiento térmico.



El aumento del tiempo de tratamiento del tratamiento térmico genera una mayor eficiencia en la eliminación de materia orgánica asociada al rompimiento de los enlaces de los carbonatos de calcio^{72 73} lo cual estaría relacionado con la mayor

⁷¹ Fihri A., Len C., Varma R. S., and Solhy A., "Hydroxyapatite : A review of syntheses , structure and applications in heterogeneous catalysis q," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 347, pp. 48–76, 2017

⁷² Mater J.. *Op. Cit.*,

⁷³ Ramirez-Gutierrez C. F., Londoño-Restrepo S. M., Real A., and Mondragón M. A., "E ff ect of the temperature and sintering time on the thermal , structural , morphological , and

pérdida de calcio evidenciada para las muestras sometidas a un mayor tiempo de sostenimiento del tratamiento térmico (Tabla 2). A partir de este análisis se determinó que 2 h es el tiempo adecuado para realizar el tratamiento térmico, debido a que su relación molar Ca/P final que es la más cercana a la teórica.

Tabla 2. Relación molar Ca/P calculada.

Tiempo de tratamiento térmico(h)	Ca (mmol)	P (mmol)	Relación Ca/P
2	8.22	5.51	1.49
4	8.14	5.55	1.47
8	8.07	5.55	1.45

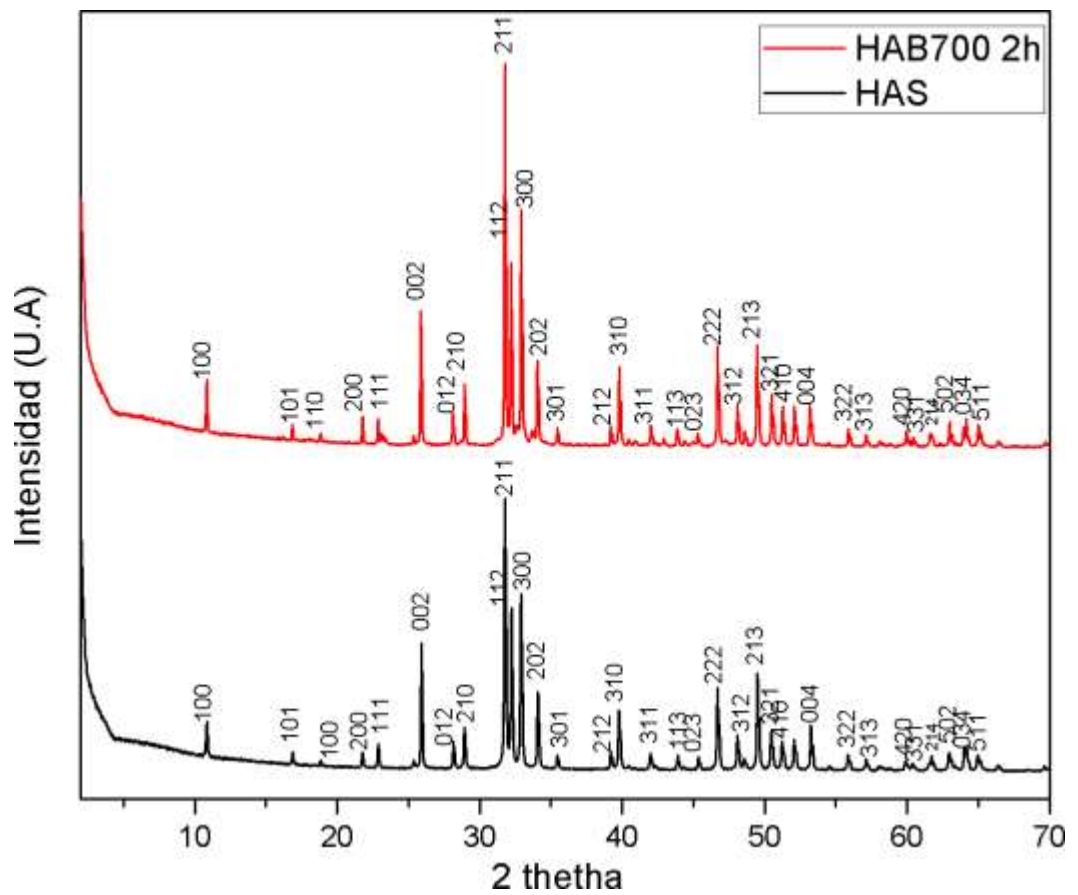
4.1.3 Determinación de la estructura cristalina por DRX. En la Figura 6 se muestra el difractograma de la muestra tratada a 700°C durante 2h, en comparación con el de una hidroxiapatita sintética (HAS) comercial de grado analítico marca ALDRICH, donde se puede observar que el material óseo tratado bajo las condiciones de tratamiento químico y térmico genera una hidroxiapatita del sistema cristalino hexagonal, con grupo espacial P63/m igual al reportado para la HAS. En la Tabla 3, se registran los parámetros de red obtenidos del refinamiento de las dos fases realizado por el método Rietveld, comparado con el reportado en las bases de datos. El cálculo cuantitativo determinó que el porcentaje de proporción de la fase hidroxiapatita en la muestra fue de 100%, lo que pone de manifiesto que se obtuvo una hidroxiapatita con un alto grado de cristalinidad y pureza.

vibrational properties of hydroxyapatite derived from pig bone,” Ceram. Int., vol. 43, no. 10, pp. 7552–7559, 2017

Tabla 3. Comparación de las características estructurales de las hidroxiapatita teórica, sintética y bovina obtenida a 700°C durante 2h.

Fase	Sistema cristalino	Grupo espacial	Parámetro de red	
			a (Å)	C (Å)
Hidroxiapatita (teórica)	Hexagonal	P63/m	9.421	6.884
Hidroxiapatita sintética			9.427	6.874
Hidroxiapatita bovina			9.422	6.879

Figura 6. Patrones DRX de HAB tratada térmicamente a 700°C con 2h de sostenimiento y de la HAS.

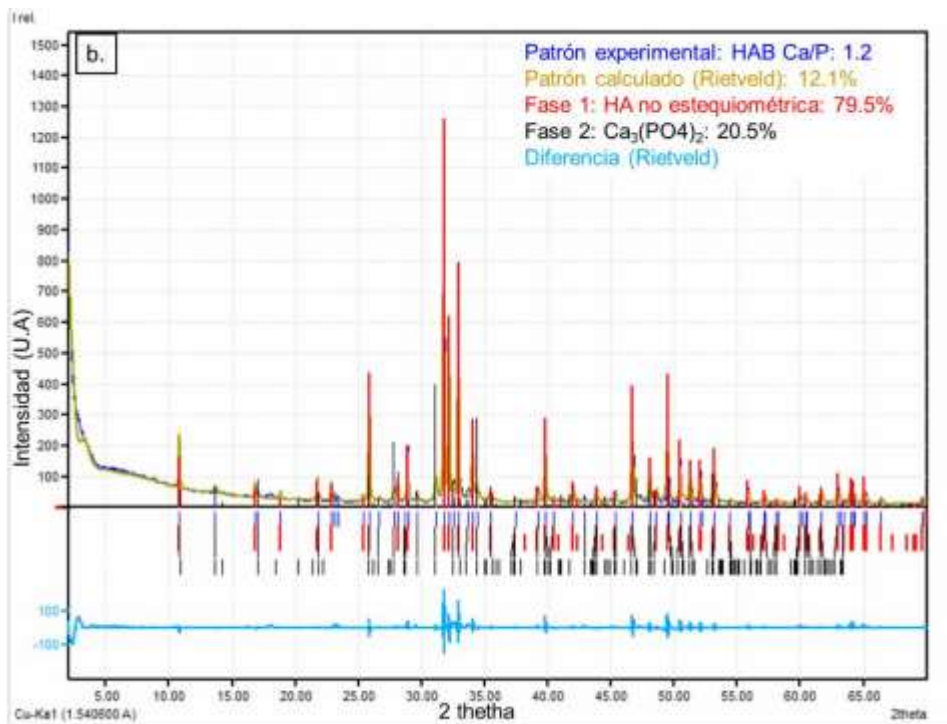
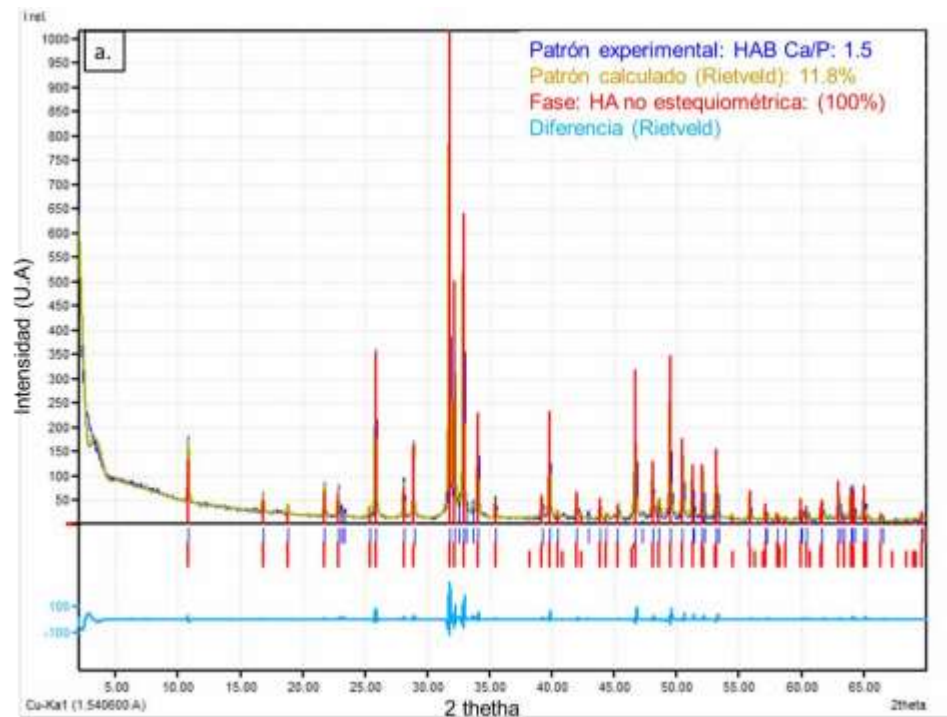


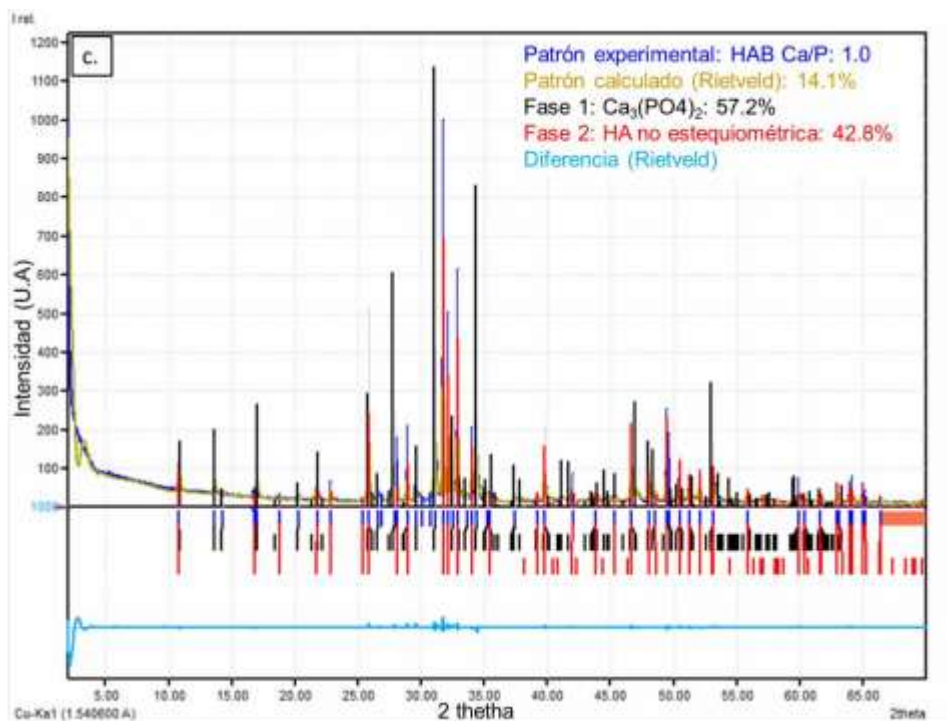
4.2 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA HAB MODIFICADA CON FÓSFORO

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la sección 5.1, la hidroxiapatita bovina tomada como base sobre la cual se realizó la modificación con fósforo correspondió a la muestra identificada como HAB700-2h, la cual tiene una relación molar Ca/P de 1.49 (blanco de partida).

4.2.1 Determinación de la estructura cristalina mediante DRX. En la Figura 7 se presenta los difractogramas y refinamientos de las muestras con las diferentes relaciones Ca/P. Como se puede observar, la adición de TIEF a la HAB promueve la formación de la fase fosfato de calcio (β -Ca₃(PO₄)₂) generando la coexistencia de las dos fases. Los índices de refinamiento obtenidos por el método Rietveld permitieron establecer para la muestra Ca/P:1.2 un porcentaje de proporción de la fase hidroxiapatita de 79.5% y de 20.5% para la fase β -Ca₃(PO₄)₂; y para la muestra Ca/P:1 porcentajes de 42.8% para la hidroxiapatita y 57.2% de β -Ca₃(PO₄)₂. A partir de los datos suministrados por los refinamientos, queda claramente establecido que la presencia de TIEF en la modificación de la HAB promueve la formación de una nueva fase cristalina que aumenta en cantidad a medida que aumenta el precursor de fósforo.

Figura 7. Refinamiento Rietveld de las muestras de HAB sin modificar (a), y modificadas: Ca/P: 1.2 (b) y Ca/P: 1.0 (c).





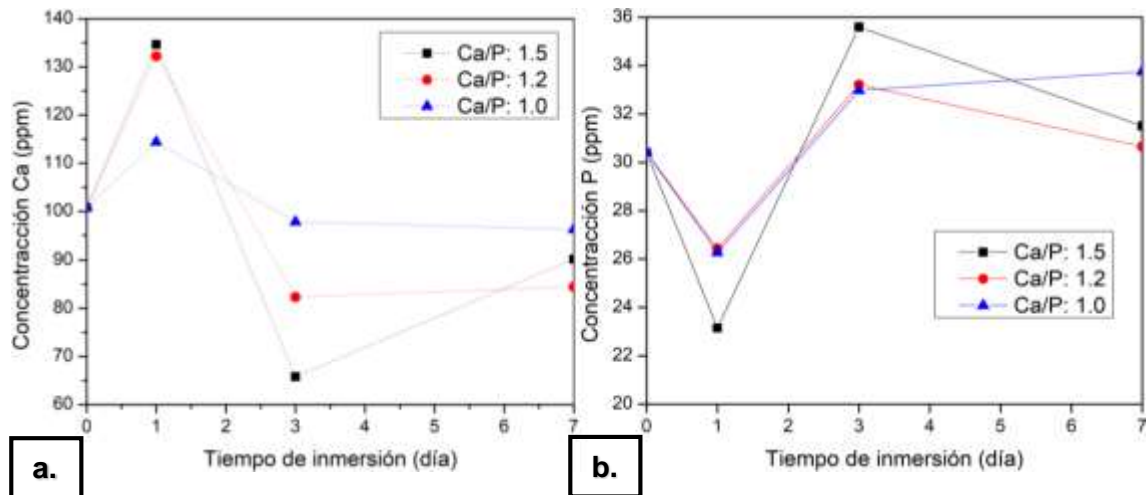
4.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y MORFOLÓGICA DE LA HAB ANTES Y DESPUÉS DEL ENSAYO DE REACTIVIDAD EN SBF

4.3.1 Determinación del contenido de calcio y fósforo presentes en la solución SBF. La Figura 8 muestra los resultados obtenidos del ensayo de reactividad química en SBF de las relaciones Ca/P a los tiempos de inmersión de 0, 1, 3 y 7 días en SBF, en los cuales se evaluó la evolución de las concentraciones de Ca y P en el tiempo.

En la Figura 8(a) se puede apreciar de forma general un aumento del contenido de Ca en la solución durante el primer día de inmersión, el cual se asocia a una primera etapa de disolución del Ca presente en el material, siendo este más drástico para las relaciones molares Ca/P 1.5 y 1.2; para el tiempo de 3 días se observa un descenso de la concentración de Ca lo cual es un indicativo de procesos de

precipitación que se están llevando sobre el material inmerso, en donde el fluido relacionado a la muestra Ca/P 1.5 muestra el mayor disminución en la concentración en comparación con las demás relaciones. Finalmente, para el día 7 el fluido de la muestra Ca/P 1.5 muestra un nuevo aumento de la concentración de Ca indicando el desarrollo de un proceso de disolución que se lleva en la superficie del material y que es característico de la formación de apatitas, por su parte los fluidos relacionados a las muestras Ca/P 1.2 y 1.0 no muestran variación de su concentración de Ca ⁷⁴.

Figura 8. Variación del calcio (a) y fósforo (b) en SBF para las relaciones de Ca/P evaluadas.



Partiendo de la idea que los procesos marcados de disolución – precipitación que se observaron estén relacionados con la formación de apatitas en la superficie del material, se podría inferir desde la base teórica que las reacciones que gobiernan este comportamiento son las siguientes:

⁷⁴ CZIKÓ M., BOGYA E. S., BARABÁS R., BIZO L., and STEFAN R., "In vitro biological activity comparison of some hydroxyapatite-based composite materials using simulated body fluid," Cent. Eur. J. Chem., vol. 11, no. 10, pp. 1583–1598, 2013

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}) \leftrightarrow 5\text{Ca}^{2+} + 3\text{PO}_4^{3-} + \text{OH}^-$ (5) proceso de disolución

$\text{Ca}^{2+} + \text{HPO}_4^{2-} \rightarrow \text{CaHPO}_4$ (6) proceso de precipitación

$4\text{Ca}^{2+} + \text{HPO}_4^{2-} + 2\text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{Ca}_4(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_3$ (7) proceso de precipitación

$5\text{Ca}^{2+} + 3\text{PO}_4^{3-} + \text{OH}^- \leftrightarrow \text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ (8) proceso de precipitación

Es interesante señalar que la variación del contenido de P en las soluciones que contienen las muestras de estudio, es totalmente opuesta a la de Ca (Figura 8(b)) este comportamiento se puede asociar con los procesos de disolución - precipitación en los cuales están alternados para las dos cargas debido a la naturaleza reversible del proceso.

Las muestras fueron analizadas mediante FTIR antes y después de la prueba de reactividad (7 días de inmersión), y los resultados presentados en la Figura 9 (a, b y c) no presentan cambios aparentes antes y después de la inmersión.

De manera general, se puede observar la presencia de las bandas a 1025 cm^{-1} de O-P-O, a 960 cm^{-1} de $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$, a 1085 cm^{-1} de $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$, a 560 cm^{-1} y 600 cm^{-1} de $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$, correspondientes a formas vibracionales del ion PO_4^{3-} que está presente en la hidroxiapatita, además de presentarse una banda a 630 cm^{-1} de O-H correspondiente a los hidroxilos presentes en la muestra. Adicionalmente, a 875 cm^{-1} se presenta una banda de HPO_4^{2-} que, según la literatura, se presenta cuando hay una disolución de la hidroxiapatita no estequiométrica en un fluido como el SBF⁷⁵; para los 7 días de inmersión se presenta una reducción en la intensidad de los picos que se asocia a la reactividad del material.

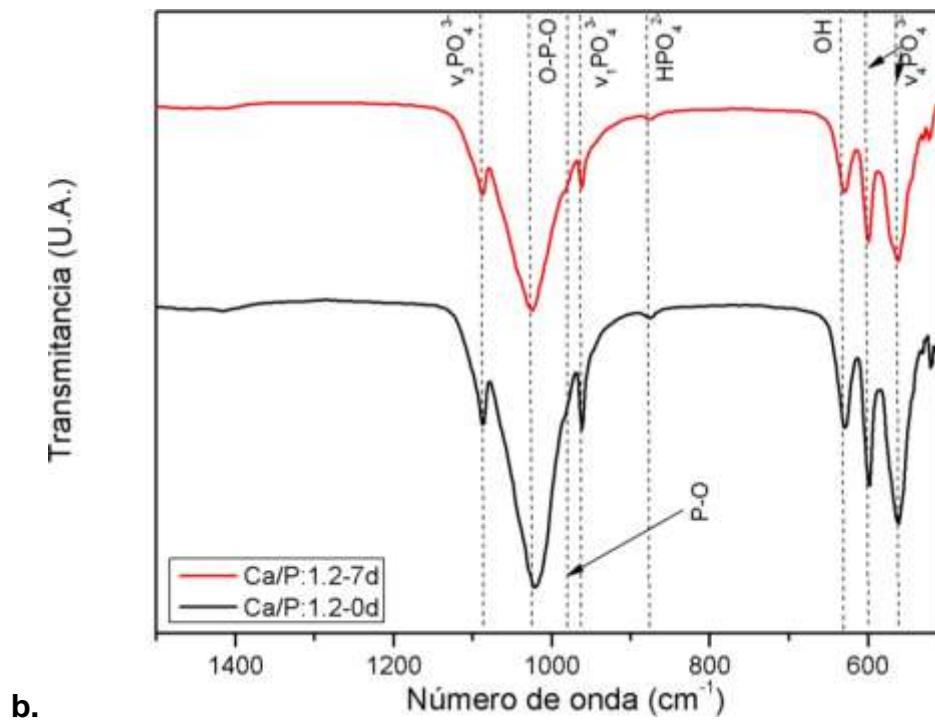
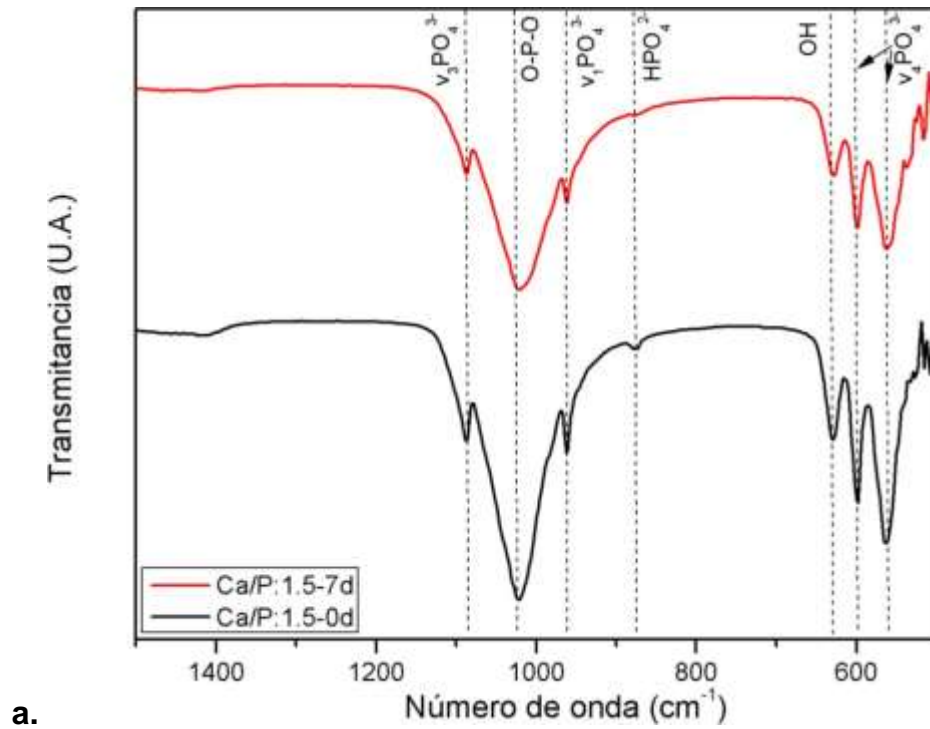
⁷⁵ SOBCZAK-KUPIEC A., WZOREK Z., KIJKOWSKA R., and KOWALSKI Z., "Effect of calcination conditions of pork bone sludge on behaviour of hydroxyapatite in simulated body fluid," Bull. Mater. Sci., vol. 36, no. 4, pp. 755–764, 2013

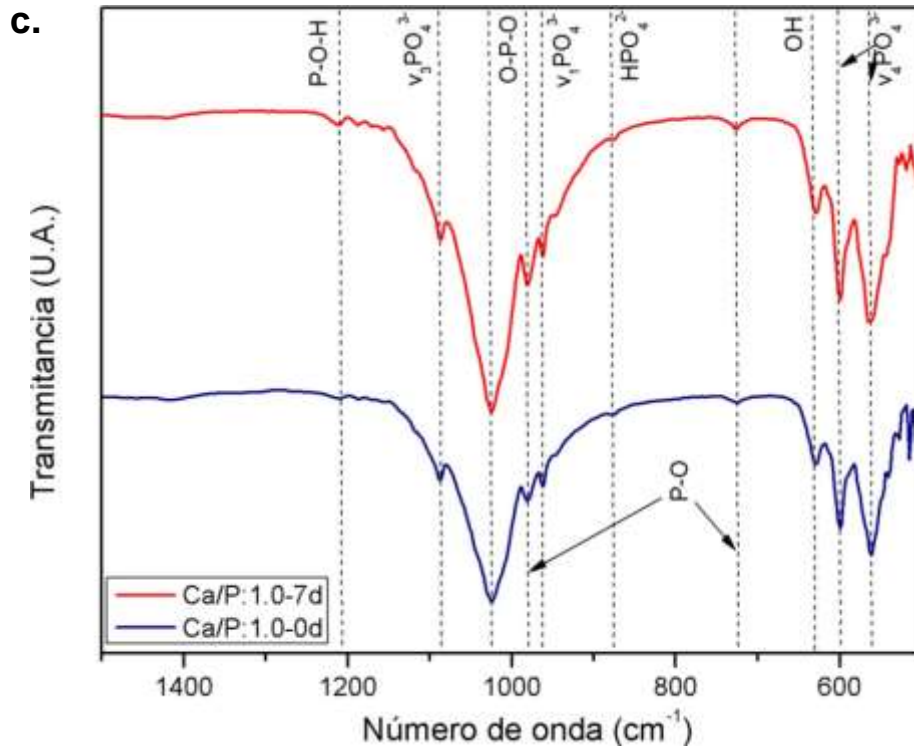
Para la relación Ca/P 1.2, se puede notar la aparición de una banda nueva a 980 cm⁻¹ de O-P la cual puede estar asociada a una transformación cristalina del ion fosfato debido al uso del precursor de fósforo TIEF ⁷⁶. Para la relación Ca/P 1.0, la banda asociada al enlace O-P a 980 cm⁻¹ se logra ver con mayor intensidad. Así mismo, se logra ver una nueva banda asociada a este enlace a 730 cm⁻¹. Finalmente, se presenta una banda a 1210 cm⁻¹ la cual es reportada para muestras que presentan alto contenido de fósforo ⁷⁷50].

⁷⁶ SINKÓ K., MEISZTERICS A., ROHONCZY J., KOBZI B., and KUBUKI S., Op. Cit.

⁷⁷ *Ibíd.*

Figura 9. Espectros FTIR de las relaciones Ca/P 1.5 (a), 1.2 (b) y 1.0 (c) a cero y siete días de inmersión en SBF.





4.4 EFECTO DE LA ADICIÓN DE P SOBRE LA MORFOLOGÍA Y COMPOSICIÓN DE LA HAB

En la Figura 10 se presenta las micrografías del análisis SEM-EDS de las muestras sometidas al ensayo de reactividad a los tiempos de 0, 3 y 7 días de inmersión en SBF.

Antes de la inmersión (0 días), las muestras con relación Ca/P de 1,5 presentan una morfología granular, constituidas por partículas poligonales bien definidas, de tamaños que varían de 3 a 5 μm de longitud, cabe mencionar que esta morfología fue homogénea en toda su superficie. Por otro lado, en las muestras con relaciones molares Ca/P de 1,2 y 1,0 la morfología granular no fue continua en toda su superficie, presentando zonas o regiones de mayor compacidad. Los detalles

mostrados en la Figura 10 permiten evidenciar granos de diferentes tamaños, cuya morfología difiere a la mostrada por la muestra con relación molar Ca/P 1.5.

En todas las muestras a tres días de inmersión se logra observar un cambio notorio en su morfología que está relacionado con procesos reactivos con el SBF, específicamente de precipitación, que fueron evidenciados en las mediciones de Ca y P en la etapa anterior. La muestra Ca/P:1.5 señala una disminución del tamaño de partícula y la formación de precipitados que se distribuyen por la superficie con una relación molar Ca/P de 1.35, según los análisis EDS, que se asemeja a la formación de hidroxiapatita deficiente en calcio comúnmente conocida como apatitas. En las muestras Ca/P 1.2 y 1.0 también se observa la formación de precipitados sectorizados en la superficie con relaciones molares de 1.57 y 1.37 respectivamente, señalando procesos de precipitación en la superficie por interacción con el SBF. Vale aclarar que a medida que se aumenta el contenido de P en las muestras la presencia de precipitados se hace cada vez menor.

El análisis morfológico de las muestras sometidas a siete días de inmersión en SBF, señala que la muestra Ca/P:1.5 formó una capa densa de apatitas que cubrió totalmente la superficie analizada y cuyo análisis EDS muestra una relación molar Ca/P de 1.5, donde dichas observaciones concuerdan con reportes realizados en diferentes investigaciones ^{78 79}. Por su lado, la relación Ca/P 1.2 revela la presencia de un precipitado aglomerado con una morfología y composición química diferente a las apatitas. Según el análisis EDS, dicho precipitado tiene altos contenidos de Ca y O, con una deficiencia en su composición de P, lo que permite inferir que posiblemente se trate de un óxido de calcio. Para el caso de la relación Ca/P 1.0 no

⁷⁸ HORKAVCOVÁ D., ROHANOVÁ D., KUNCOVÁ L., ZÍTKOVÁ K., ZLÁMALOVÁ CÍLOVÁ Z., and HELEBRANT A., Op. Cit.

⁷⁹ ANDREA J., HERMANN-MUÑOZ J. A., ID A. L. G., DE VIZCAYA-RUIZ A., ALVARADO-OROZCO, J. M. and MUÑOZ-SALDAÑA J., "Synthetic and Bovine-Derived Hydroxyapatite Ceramics: A Comparison," 2000

se observan precipitados ni formación de apatitas en la superficie del material y que los pocos precipitados formados en tiempos anteriores se disolvieron en el fluido.

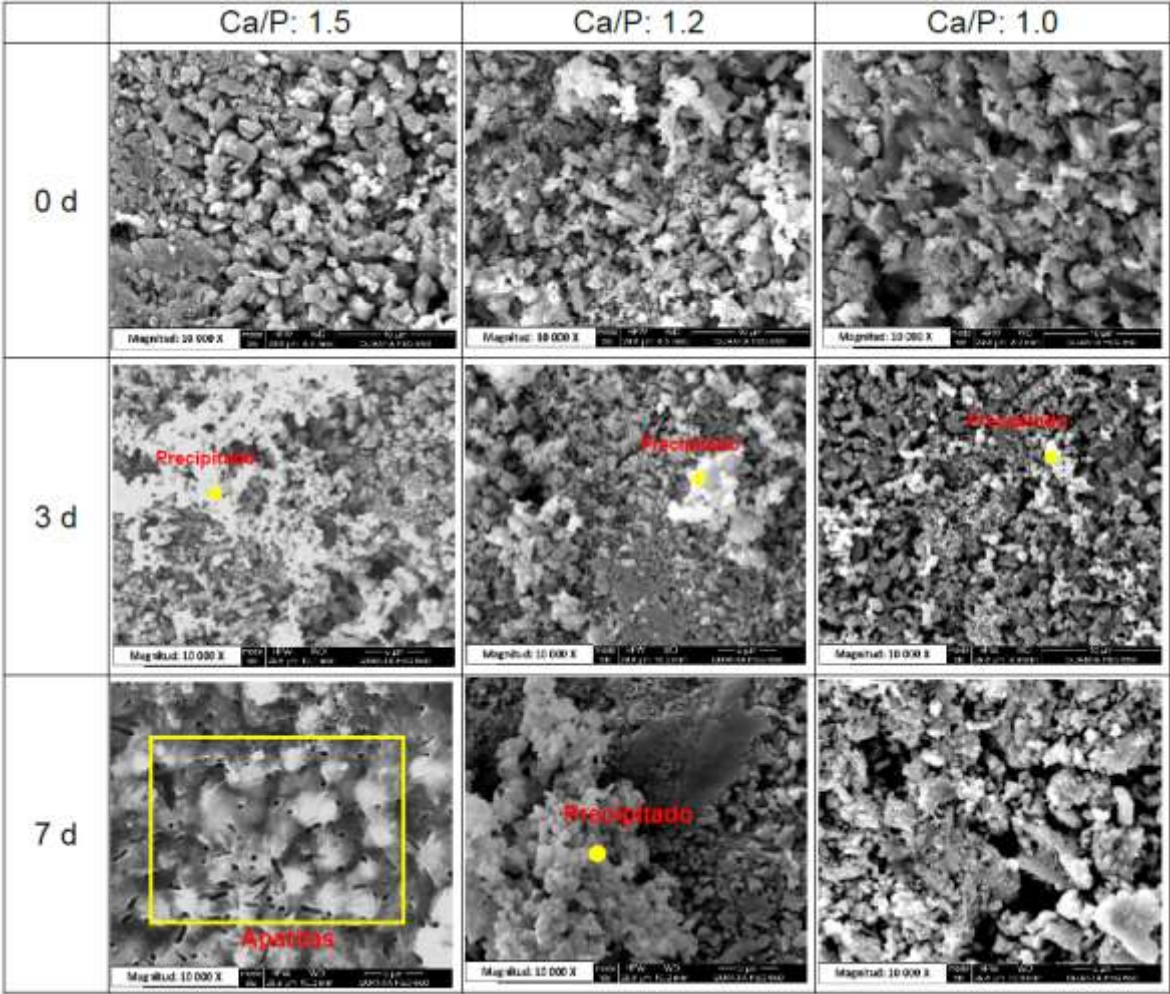
La no precipitación de apatitas en las relaciones Ca/P 1.2 y 1.0 puede ser explicado por la formación de la fase cristalina β -Ca₃(PO₄)₂, diferentes investigaciones han señalado que la presencia de esta fase en la hidroxiapatita ralentiza la reactividad del material en el SBF, lo cual concuerda con el hecho de que a mayor presencia de esta fase cristalina la superficie se hace menos reactiva ⁸⁰61] ⁸¹63] ⁸²64].

⁸⁰ SOBCZAK-KUPIEC A., WZOREK Z., KIJKOWSKA R., and KOWALSKI Z.,

⁸¹ HASHIZUME M., NAGASAWA Y., SUZUKI T., KAWASHIMA S., and KAMITAKAHARA M. , “Effect of preparative conditions on crystallinity of apatite particles obtained from simulated body fluids,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 84, no. 2, pp. 545–549, 2011

⁸² VUONG B. X., “Synthesis and characterization of HA / β -TCP bioceramic powder,” vol. 56, no. 3, pp. 152–155, 2018

Figura 10. SEM y EDS de las relaciones Ca/P evaluadas a 0, 1 y 7 días de inmersión en SBF.



5. CONCLUSIONES

- Los resultados de caracterización química y estructural demostraron que el tratamiento químico con NaOH y térmico a 700°C durante 2 h de hueso bovino permite la obtención de hidroxiapatita de alta cristalinidad y pureza, comparable con las características estructurales de los reportes teóricos y de la hidroxiapatita sintética comercial de SIGMA-ALDRICH.
- A partir de la hidroxiapatita bovina obtenida de alta pureza, se estableció que la disolución de esta en HNO₃ se hace necesario para lograr integración del precursor de fósforo y permitir la modificación de la hidroxiapatita con el ion fosfato cuando se trata térmicamente la muestra nuevamente a 700°C durante 2 horas.
- Se estableció que la adición del TIEF (precursor de fósforo) a la hidroxiapatita bovina modifica su morfología y promueve la formación de una nueva fase denominada fosfato de calcio (β -Ca₃(PO₄)₂) la cual coexiste con la hidroxiapatita; y que a medida que se aumenta la concentración de TIEF la proporción de la nueva fase crece a expensas de la disminución de la hidroxiapatita.
- Los ensayos de reactividad *in vitro* llevados a cabo en SBF permitieron establecer que la hidroxiapatita bovina sin adición de TIEF muestra un alto carácter reactivo en el medio evaluado dando lugar a la formación de apatitas en la superficie a corto tiempos de exposición; por el contrario, la hidroxiapatita bovina con contenidos de TIEF no presentó formación de apatitas por efecto de la fase β -Ca₃(PO₄)₂ que se ha demostrado tiene muy baja reactividad.

BIBLIOGRAFÍA

ABIDI S. S. A. and MURTAZA Q., "Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction," *J. Mater. Sci. Technol.*, vol. 30, no. 4, pp. 307–310, 2014

ADDADI L., RAZ S., and WEINER S., "Taking advantage of disorder: Amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization," *Adv. Mater.*, vol. 15, no. 12, pp. 959–970, 2003

AGRAWAL K., SINGH G., PURI D., and PRAKASH S., "Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Powder by Sol-Gel Method for Biomedical Application," *J. Miner. Mater. Charact. Eng.*, vol. 10, no. 08, pp. 727–734, 2011

ALLAIS M. et al., "Comparative study of bone regeneration in critical cranial bone defects using bone marrow adult stem cells and calcium phosphate," *Rev. Esp. Cir. Oral y Maxilofac.*, vol. 37, no. 1, pp. 15–22, 2015

ANDREA J., HERMANN-MUÑOZ J. A., ID A. L. G., DE VIZCAYA-RUIZ A., ALVARADO-OROZCO, J. M. and MUÑOZ-SALDAÑA J., "Synthetic and Bovine-Derived Hydroxyapatite Ceramics : A Comparison," 2000

ANJANEYULU U., PATTANAYAK D. K., and VIJAYALAKSHMI U., "Snail Shell Derived Natural Hydroxyapatite: Effects on NIH-3T3 Cells for Orthopedic Applications," *Mater. Manuf. Process.*, vol. 31, no. 2, pp. 206–216, 2016

ANVARI-YAZDI A. F., YAZDANI A., TALAEI-KHOZANI T., and KALANTAR M., "Extraction and Viability Checking of Various Carbonated Hydroxyapatite by Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell," *Sci. Int.*, vol. 1, no. 5, pp. 132– 138, 2013

AYATOLLAHI M. R., YAHYA M. Y., ASGHARZADEH SHIRAZI H., and HASSAN S. A., "Mechanical and tribological properties of hydroxyapatite nanoparticles extracted from natural bovine bone and the bone cement developed by nano-sized bovine hydroxyapatite filler," *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 9, pp. 10818–10827, 2015

AZIS Y., ADRIAN M., ALFARISI C. D., KHAIRAT, and SRI R. M., "Synthesis of hydroxyapatite nanoparticles from egg shells by sol-gel method," *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 345, no. 1, 2018

BELLUCCI D., SOLA A., GAZZARRI M., CHIELLINI F., and CANNILLO V., "A new hydroxyapatite-based biocomposite for bone replacement," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 3, pp. 1091–1101, 2013

BIANCO A., CACCIOTTI I., LOMBARDI M., and MONTANARO L., "Si-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sinterability," *Mater. Res. Bull.*, vol. 44, no. 2, pp. 345–354, 2009

CAROLINA D. and COY L., "Obtención y caracterización de Obtaining and Characterization of Hydroxyapatite doped with," 2016

CATTINI A., BELLUCCI D., SOLA A., PAWŁOWSKI L., and CANNILLO V., "Functional bioactive glass topcoats on hydroxyapatite coatings: Analysis of microstructure and in-vitro bioactivity," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 240, pp. 110–117, 2014

CHAAIR H., LABJAR H., and BRITEL O., "Synthèse du phosphate tricalcique- β ," Morphologie, vol. 101, no. 334, pp. 120–124, 2017

CZIKÓ M., BOGYA E. S., BARABÁS R., BIZO L., and STEFAN R., "In vitro biological activity comparison of some hydroxyapatite-based composite materials using simulated body fluid," Cent. Eur. J. Chem., vol. 11, no. 10, pp. 1583–1598, 2013

DIOXIDE D. C. et al., "Standard Specification for Composition of Anorganic Bone for Surgical Implants 1," vol. 08, no. Reapproved 2016, pp. 8–11, 2019

EL KAMARY Y. and MOUSSA R. M., Synthesis , Properties , and Applications of Hydroxyapatite. 2012

FIHRI A., LEN C., VARMA R. S., and SOLHY A., "Hydroxyapatite : A review of syntheses , structure and applications in heterogeneous catalysis q," Coord. Chem. Rev., vol. 347, pp. 48–76, 2017

FRASNELLI M. et al., "Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration," Mater. Sci. Eng. C, vol. 71, pp. 653–662, 2017

GARCÍA-GARDUÑO J., REYES-GASGAY Margarita Victoria;, "La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica ," Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas, vol. 9, no. 2, pp. 90–95, 2006

GE LIFE SCIENCES, "Use of sodium hydroxide for cleaning and sanitization of chromatography media and systems - Application note 18-1124-57 AI," no. 3, p. Process chromatography, 2014

GHOSH R. and SARKAR R., "Synthesis and characterization of sintered beta-tricalcium phosphate: A comparative study on the effect of preparation route," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 67, pp. 345–352, 2016

GODOY-MONZON D., BUTTARO M., COMBA F., ZANOTTI G., PICCALUGA F., and NEIRA-BORRAJO I., "Resultados de un vástago con cobertura completa de hidroxiapatita con un seguimiento mínimo de 5 años," *Rev. Esp. Cir. Ortop. Traumatol.*, vol. 61, no. 6, pp. 390–396, 2017

GOTO T. and SASAKI K., "Effects of trace elements in fish bones on crystal characteristics of hydroxyapatite obtained by calcination," *Ceram. Int.*, vol. 40, no. 7 PART B, pp. 10777–10785, 2014

HASHIZUME M., NAGASAWA Y., SUZUKI T., KAWASHIMA S., and KAMITAKAHARA M., "Effect of preparative conditions on crystallinity of apatite particles obtained from simulated body fluids," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 84, no. 2, pp. 545–549, 2011

HORKAVCOVÁ D., ROHANOVA D., KUNCOVÁ L., ZÍTKOVÁ K., ZLÁMALOVÁ CÍLOVÁ Z., and HELEBRANT A., "Comparison of reactivity of synthetic and bovine hydroxyapatite in vitro under dynamic conditions," *Ceram. - Silikaty*, vol. 58, no. 1, pp. 70–78, 2014

HUTCHENS S. A., CAMPION C., ASSAD M., CHAGNON M., and HING K. A., "Efficacy of silicate-substituted calcium phosphate with enhanced strut porosity as a standalone bone graft substitute and autograft extender in an ovine distal femoral critical defect model," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–12, 2016

JIANG S. D., YAO Q. Z., MA Y. F., ZHOU G. T., and FU S. Q., "Phosphate-dependent morphological evolution of hydroxyapatite and implication for biomineralisation," *Gondwana Res.*, vol. 28, no. 2, pp. 858–868, 2015

KAYGILI O., KESER S., BULUT N., and ATES T., "Characterization of Mg-containing hydroxyapatites synthesized by combustion method," *Phys. B Condens. Matter*, vol. 537, no. 3, pp. 63–67, 2018

KHALIL K. A., "A new-developed nanostructured Mg/HAp nanocomposite by high frequency induction heat sintering process," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 7, no. 11, pp. 10698–10710, 2012

KRAMER E., ITZKOWITZ E., and WEI M., "Synthesis and characterization of cobalt-substituted hydroxyapatite powders," *Ceram. Int.*, vol. 40, no. 8 PART B, pp. 13471–13480, 2014.

KRISHNAMURITHY G., MURALI M. R., HAMDY M. ABBAS, A. A., RAGHAVENDRAN H. B., and KAMARUL T., "Characterization of bovine-derived porous hydroxyapatite scaffold and its potential to support osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells," *Ceram. Int.*, vol. 40, no. 1 PART A, pp. 771–777, 2014

KRZESIŃSKA M. and MAJEWSKA J., "Physical properties of continuous matrix of porous natural hydroxyapatite related to the pyrolysis temperature of animal bones precursors," *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, vol. 116, pp. 202–214, 2015

KUŚNIERUK S., WOJNAROWICZ J., CHODARA A., CHUDOBA T., GIERLOTKA S., and LOJKOWSKI W., "Influence of hydrothermal synthesis parameters on the properties of hydroxyapatite nanoparticles," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 1, pp. 1586–1601, 2016

ŁĄCZKA M., CHOLEWA-KOWALSKA K., and OSYCZKA A. M., "Bioactivity and osteoinductivity of glasses and glassceramics and their material determinants," *Ceram. Int.*, vol. 42, no. 13, pp. 14313–14325, 2016

LI L., ZHAO M., LI J., ZUO Y., ZOU Q., and LI Y., "Preparation and cell infiltration of lotus-type porous nano-hydroxyapatite/polyurethane scaffold for bone tissue regeneration," *Mater. Lett.*, vol. 149, pp. 25–28, 2015

LJUBIŠA Đ. et al., "Scanning Electron Microscopy Analysis of Changes of Hydroxiapatite/Poly-L-Lactide With Different Molecular Weight of Plla After Intraperitoneal Implantation," *Acta Vet.*, vol. 6646017018, no. 616, pp. 234– 244, 2016

MATER J.. "The effect of cyclic heat treatment on the physicochemical properties of bio hydroxyapatite from bovine bone," *Sci. Mater. Med.*, 2018

MAVROPOULOS E., ROSSI A. M., DA ROCHA N. C. C., SOARES G. A., MOREIRA J. C., and MOURE G. T., "Dissolution of calcium-deficient hydroxyapatite synthesized at different conditions," *Mater. Charact.*, vol. 50, no. 2–3, pp. 203–207, 2003

MEJÍA-MARTÍNEZ E. E., MATAMOROS-VELOZA Z., YANAGISAWA K., RENDÓN-ÁNGELES, J. C. and MORENO-PÉREZ B., "Influence of temperature on hydrothermal hot-pressing of magnesium hydroxyapatite powder," *Bol. la Soc. Esp. Ceram. y Vidr.*, vol. 57, no. 2, pp. 45–54, 2017

MEJÍA-MARTÍNEZ E. E., MATAMOROS-VELOZA Z., YANAGISAWA K., RENDÓN-ÁNGELES J. C., and MORENO-PÉREZ B., "Influence of temperature on hydrothermal hot-pressing of magnesium hydroxyapatite powder," *Bol. la Soc. Esp. Ceram. y Vidr.*, 2017

NANDI S. K., KUNDU B., MUKHERJEE J., MAHATO A., DATTA S., and BALLA V. K., "Converted marine coral hydroxyapatite implants with growth factors: In vivo bone regeneration," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 49, pp. 816–823, 2015

NIAKAN A. et al., "Sintering behaviour of natural porous hydroxyapatite derived from bovine bone," *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 2, pp. 3024–3029, 2015

OKUDA T. et al., "The slow resorption with replacement by bone of a hydrothermally synthesized pure calcium-deficient hydroxyapatite," *Biomaterials*, vol. 29, no. 18, pp. 2719–2728, 2008.

PEREZ GONZALEZ J. A., "Síntesis de biovidrios por la técnica sol-gel con incorporación de metales y estudio de sus propiedades antibacteriales," p. 63, 2012

RAHAVI S. S., GHADERI O., MONSHI A., and FATHI M. H., "A comparative study on physicochemical properties of hydroxyapatite powders derived from natural and synthetic sources," *Russ. J. Non-Ferrous Met.*, vol. 58, no. 3, pp. 276–286, 2017.

RAMESH S. et al., "Characterization of biogenic hydroxyapatite derived from animal bones for biomedical applications," *Ceram. Int.*, vol. 44, no. 9, pp. 10525–10530, 2018

RAMIREZ-GUTIERREZ C. F., LONDOÑO-RESTREPO S. M., REAL A., and MONDRAGÓN M. A., "Effect of the temperature and sintering time on the thermal, structural, morphological, and vibrational properties of hydroxyapatite derived from pig bone," *Ceram. Int.*, vol. 43, no. 10, pp. 7552–7559, 2017

RAZ S., WEINER S., and ADDADI L., "Formation of high-magnesian calcites via an amorphous precursor phase: Possible biological implications," *Adv. Mater.*, vol. 12, no. 1, pp. 38–42, 2000

REALES G. and LOCHER A., “Biología del Tejido Óseo,” *Man. Implantol. Básica*

SAKTHIVEL P. and RAGU A., “Synthesis and Characterization of Nano Hydroxyapatite with Polymer Matrix Nano Composite for Biomedical Applications,” *Int. J. Chem. Environ. Biol. Sci.*, vol. 3, no. 5, pp. 383–385, 2015

SCALERA F. et al., “Strategies to Improve Bioactivity of Hydroxyapatite Bone Scaffolds,” *Key Eng. Mater.*, vol. 758, pp. 132–137, 2017

SEQUEDA L. G., DÍAZ J. M., GUTIÉRREZ S. J., PERDOMO S. J., and GÓMEZ O. L., “Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo,” *Rev. Colomb. Ciencias Químico-Farmacéuticas*, vol. 41, no. 1, pp. 50–66, 2012.

SINKÓ K., MEISZTERICS A., ROHONCZY J., KOBZI B., and KUBUKI S., “Effect of phosphorus precursors on the structure of bioactive calcium phosphate silicate systems,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 73, pp. 767–777, 2017

SOBCZAK-KUPIEC A., WZOREK Z., KIJKOWSKA R., and KOWALSKI Z., “Effect of calcination conditions of pork bone sludge on behaviour of hydroxyapatite in simulated body fluid,” *Bull. Mater. Sci.*, vol. 36, no. 4, pp. 755–764, 2013

TÉLLEZ JIMÉNEZ H., GUERRERO DEL ÁNGEL F., and TORRES BENITEZ J. M., “Estudio de hidroxiapatita natural vs sintética en su aceptación biológica y eficacia regenerativa ósea en modelo animal,” *Rev. Oral*, no. 32, pp. 533–536, 2009

TIAN T., JIANG D., ZHANG J., and LIN Q., “Synthesis of Si-substituted hydroxyapatite by a wet mechanochemical method,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 28, no. 1, pp. 57–63, 2008

TREDWIN C. J., YOUNG A. M., GEORGIU G., SHIN S. H., KIM H. W., and KNOWLES J. C., "Hydroxyapatite, fluor-hydroxyapatite and fluorapatite produced via the sol-gel method. Optimisation, characterisation and rheology," *Dent. Mater.*, vol. 29, no. 2, pp. 166–173, 2013

TRUJILLO D. M., ISABEL I. D., BRITO M., and RENÉ I. I., "Injertos óseos en implantología oral Bone grafts in oral implantology," *Rev. Medica Electron.*, vol. 36, no. 4, pp. 449–461, 2014

VUONG B. X., "Synthesis and characterization of HA / β -TCP bioceramic powder," vol. 56, no. 3, pp. 152–155, 2018

WANG D. G., CHEN C. Z., YANG X. X., MING X. C., and ZHANG W. L., "Effect of bioglass addition on the properties of HA/BG composite films fabricated by pulsed laser deposition," *Ceram. Int.*, vol. 44, no. 12, pp. 14528–14533, 2018

YAZDANPANA H. Z., BAHROLOLOOM M. E., and HASHEMI B., "Evaluating morphology and mechanical properties of glass-reinforced natural hydroxyapatite composites," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 41, pp. 36–42, 2015

ZHANG Q., SCHMELZER E., GERLACH J. C., and NETTLESHIP I., "A microstructural study of the degradation and calcium release from hydroxyapatite-calcium oxide ceramics made by infiltration," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 73, pp. 684–691, 2017