



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA UTILIZANDO ARGININA PARA GENERAR ORIENTACIÓN CRISTALINA PREFERENCIAL

Opción de titulación

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:

INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

Presenta:

Carlos Enrique García Sánchez

Dirigido por:

Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo

Centro Universitario

Querétaro, QRO.

México.

Octubre, 2020



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Licenciatura en Ingeniería en Nanotecnología

SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA UTILIZANDO ARGININA PARA GENERAR ORIENTACIÓN CRISTALINA PREFERENCIAL

Opción de titulación

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Ingeniero en Nanotecnología

Presenta:

Carlos Enrique García Sánchez

Dirigido por:

Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo

SINODALES

Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo
Presidente

Dr. Rufino Nava Mendoza
Secretario

Dr. José Rafael Alanís Gómez
Vocal

Dra. Karen Esquivel Escalante
Suplente

Centro Universitario
Querétaro, QRO.
México.
Octubre, 2020

RESUMEN

El uso de Aminoácidos (AAs) como reguladores y orientadores de crecimiento cristalino en la síntesis de Hidroxiapatita (HAp), ha permitido obtener un producto de alta pureza, con una morfología, tamaño, composición química; y propiedades mecánicas como flexibilidad, resistencia a la compresión y elasticidad que son similares a las del tejido duro, obteniendo así un biomaterial que pueda ser utilizado como sustituto de tejido óseo. Sin embargo, esto solo se ha logrado obtener al utilizar un AA con carga negativa, Ácido Glutámico (Glu). En la presente tesis se estudió el efecto de utilizar un aminoácido con carga positiva, Arginina (Arg), como regulador en el proceso de crecimiento y orientación cristalina de la HAp. Se describe la síntesis de nanoestructuras HAp con morfologías y orientaciones distintas por medio del método hidrotermal asistido por microondas, usando diferentes concentraciones de Arg en base a relaciones molares de Arginina: Calcio. La caracterización de las muestras se realizó mediante análisis por Difracción de Rayos X (XRD), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Análisis Termogravimétrico (TGA) y Fluorescencia de Rayos X (XRF). Las muestras de HAp obtenidas se vieron afectadas debido a un contaminante de silicio presente en la síntesis, sin embargo, estas se obtuvieron con una ligera orientación en el plano (002), y morfologías en forma de fibras, placas y esferas en escala nanométrica. La relación Ca/P se vio afectada debido al alto porcentaje de silicio presente en las muestras.

(Palabras Clave: Hidroxiapatita, Arginina, aminoácidos, crecimiento cristalino, orientación cristalina preferencial).

ABSTRACT

The use of Amino Acids (AAs) as regulators and guides of crystalline growth in the synthesis of Hydroxyapatite (HAp), has allowed to obtain a product of high purity, with a morphology, size, chemical composition; and mechanical properties such as flexibility, resistance to compression and elasticity that are similar to those of hard tissue, thus obtaining a biomaterial that can be used as a substitute for bone tissue. However, this has only been achieved by using a negatively charged AA, Glutamic Acid (Glu). In the present thesis the effect of using a positively charged amino acid, Arginine (Arg), as a regulator in the growth process and crystalline orientation of HAp was studied. The synthesis of HAp nanostructures with different morphologies and orientations is described by means of the microwave-assisted hydrothermal method, using different concentrations of Arg based on Arginine: Calcium molar ratios. The samples characterization was carried out by X-ray Diffraction analysis (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Thermogravimetric Analysis (TGA) and X-ray Fluorescence (XRF). The HAp samples obtained were affected due to a silicon contaminant present in the synthesis, however, these were obtained with a slight orientation in the (002) plane, and morphologies in the form of fibers, plates and spheres on a nanometric scale. The Ca/P ratio was affected due to the high percentage of silicon present in the samples.

(Key words: Hydroxyapatite, Arginine, aminoacids, cristalline growth, preferential crystalline orientation)

DEDICATORIAS

A mi madre, por su amor incondicional, quién siempre ha estado a mi lado y me ha apoyado en todo a lo largo de mi vida y de mi formación académica. A mi padre, por su amor, sus enseñanzas, consejos y motivación para seguir adelante. A mi hermana por estar conmigo en las buenas y en las malas, y darme toda su fuerza y apoyo para seguir adelante. Ustedes son los pilares de mi vida.

A mi abuelita Lina, que en paz descanse, y a mi abuelita Chunchu por preocuparse siempre por mí, por todo su amor, sus consejos y enseñanzas y porque siempre me han dado su bendición.

A Aris, pareja de mi mamá, por su apoyo incondicional.

A mi tía Marta, quien a pesar de la distancia me ha brindado su apoyo a lo largo de mi carrera y me ha impulsado a lograr mis metas.

A mi novia Ceci, por estar conmigo en esta etapa tan importante de mi vida, motivarme y brindarme su apoyo emocional.

A mis tíos por todo el apoyo, consejos y la confianza que han puesto en mí.

A mis amigos, por todos esos momentos de alegría que me han brindado, su sinceridad y por motivarme a lograr todo lo que me proponga.

A todos con mucho cariño,

Carlos Enrique García Sánchez.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Dr. Rodrigo Velázquez Castillo, por guiarme durante toda la investigación, y por apoyarme en el análisis de resultados y revisión de esta tesis.

A mis sinodales el Dr. Rufino Nava, el Dr. Rafael Alanis, y la Dra. Karen Esquivel por sus sugerencias, correcciones y comentarios en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Eric Rivera Muñoz, la Dra. Carmen L. Peza Ledesma y la Dra. Beatriz Millán por su gran apoyo en la realización de los análisis de Fluorescencia de Rayos X, Difracción de Rayos X y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) – UNAM por permitirme hacer uso de sus instalaciones para que pudiera llevar a cabo parte de este proyecto.

Al M. en C. Eduardo Rubio por apoyarme durante la síntesis de las muestras de hidroxiapatita.

A la M. en C. Ileri Segura por su apoyo en la realización de los análisis de Termogravimetría (TGA).

Al Fondo para el Fortalecimiento de la Investigación (FOFI-UAQ), proyecto FIN201813.

INDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE GENERAL	v
INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. Marco Teórico	3
2.1 Hueso	3
2.2 Biomineralización.	4
2.3 Mecanismo de crecimiento de la Hidroxiapatita.	5
2.4 Estructura cristalina de la Hidroxiapatita.	7
2.5 Métodos de síntesis.	13
2.6 Cristalización de soluciones.	16
2.7 Aminoácidos.	17
2.7.1 Propiedades de los aminoácidos ácido-base.	18
2.8 Aplicaciones de la Hidroxiapatita.	22
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.	24
4.1 Hipotesis.	24
4.2 Objetivos.	24
4.2.1 Objetivo general.	24
4.2.2 Objetivos específicos.	25

5. METODOLOGÍA.	25
5.1 Síntesis de Hidroxiapatita.	25
5.2 Caracterización de la Hidroxiapatita sintética	28
5.2.1 Difracción de rayos X por polvos (XRD)	28
5.2.2 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	29
5.2.3 Fluorescencia de rayos X (FRX)	30
5.2.4 Análisis Termogravimétrico(TGA)	30
6. RESULTADOS	32
6.1 Difracción de rayos X por polvos (XRD)	32
6.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	36
6.3 Florescencia de Rayos X	41
6.4 Análisis Termogravimétrico (TGA)	43
7. Conclusiones	47
8. Referencias	48
9. ANEXO	57
9.1 Método Hidrotermal asistido por microondas	57
9.2 Fundamento de difracción de Rayos X	58
9.3 Funcionamiento de microscopio electrónico de barrido (SEM)	58
9.4 Fundamento de fluorescencia de Rayos X	59
9.5 Fundamento del análisis termogravimétrico (TGA)	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Morfologías de HAp mediante diferentes métodos de síntesis (Huerta, 2018).....	13
Tabla 2.2 Comparación de los métodos más sofisticados para la síntesis de HAp. (Campa et al., 2007).....	14
Tabla 2.3 Punto isoiónico (pI) ó isoeléctrico (pH _i) y polaridad de los 20 aminoácidos esenciales para el cuerpo humano. (Fleck & Petrosyan, 2016; Rogers, 2011).....	20
Tabla 6.1 Porcentaje elemental, relaciones Ca/P en peso y atómicas de las diferentes muestras de HAp cuantificadas mediante la técnica de XRF.....	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Esquema de la fibra de colágeno. Imagen extraída del libro Ciencia de Materiales, Aplicaciones en Ingeniería, Newell pp. 276	3
Figura 2.2 Comparación de cristales simples de calcita: (izquierda) estereoma de equinodermo y (derecha) formas romboédricas producidas sintéticamente. Imagen extraída de Weiner, 2003.	5
Figura 2.3 Estructura del Calcio tipo I(a,b) y Calcio tipo II(c,d). Modificado de Campa et al., 2007	8
Figura 2.4 Izquierda: Grupo fosfato, Derecho grupo OH. Modificado de Campa et al., 2007	9
Figura 2.5 Simulación gráfica de la hidroxiapatita. Modificado de Campa et al., 2007.	10
Figura 2.6 Interacción del Ca(II) con el grupo OH y los grupos fosfato. Modificado de Campa et al., 2007.	10
Figura 2.7 Apilamiento de los prismas trigonales triapuntados correspondientes a calcio tipo 1. Modificado de Campa et al., 2007.....	11
Figura 2.8 Partículas de hidroxiapatita de cristales simples con orientación preferencial en los ejes a y c como modelos para tejidos duros: hueso y esmalte dental. Modificado de Aizawa et al., 2013.	12
Figura 2.9. Estructura de los aminoácidos(Ouellette & Rawn, 2015)	17

Figura 2.10 Propiedades de los aminoácidos a) zwitterión o ión dipolo, b) formación de base conjugada y c) formación de ácido conjugado. Modificada de Ouellete and Rawn 2018.....	19
Figura 2.11 Estructura química de el aminoácido L-Arginina con el grupo guanidino.	22
Figura 5.1 (izquierda) Microondas Synthos 3000 de anton para y rotores; (derecha) vial de cuarzo presurizable con la tapa y chaqueta protectora.....	26
Figura 5.2 Viales de cuarzo para rotor XQ80 con mezcla de soluciones	27
Figura 5.3 Muestra de HAp sintetizada mediante el método hidrotermal asistido por microondas	28
Figura 5.4 Difractómetro de rayos X Ultima IV de Rigaku.	29
Figura 5.5 Equipo de fluorescencia de rayos X S2 PUMA de Bruker.....	30
Figura 5.6 TGA Q500 TA Instruments.	31
Figura 6.1 Difractograma típico de una muestra de HAp hexagonal con crecimiento cristalino aleatorio.....	33
Figura 6.2 Difractograma típico de HAp sintetizada con una relación molar de arginina: calcio de 2:1.....	34
Figura 6.3 Difractograma de HAp sintetizada con una relación molar de arginina: calcio de 3:1.....	35
Figura 6.4 Difractograma de HAp sintetizada con una relación molar de arginina: calcio de 5:1.....	36
Figura 6.5 Micrografías de la muestra de HAp sintetizada utilizando una relación molar arginina: calcio de 2:1.....	38
Figura 6.6 micrografías de SEM de la muestra de HAp sintetizada con una relación molar arginina: calcio de 3:1.....	39
Figura 6.7 Micrografías de SEM de la muestra de HAp obtenida utilizando una relación molar arginina: calcio de 5:1.	40
Figura 6.8 Espectro representativo de un análisis XRF de una muestra de HAp. .	41
Figura 6.9 micrografía de SEM típica de la HAp obtenida utilizando ionomero de vidrio para controlar el crecimiento cristalino.....	43

Figura 6.10 Análisis TGA para la Hidroxiapatita sintetizada con una relación molar de arginina: Calcio 2:1	44
Figura 6.11 Análisis TGA para la Hidroxiapatita sintetizada con una relación molar de arginina: calcio 3:1	45
Figura 6.12 Análisis TGA para la Hidroxiapatita sintetizada con una relación molar de arginina: calcio 5:1	46
Figura 9.1 Comparación de la distribución de la temperatura durante un calentamiento microondas y uno convencional. (Prado & Morán, 2011)	57

Dirección General de Bibliotecas UAQ

1. INTRODUCCIÓN

El hueso artificial se le define como al material similar al hueso creado en un laboratorio, el cual puede utilizarse en injertos óseos, para reemplazar el hueso humano que se perdió debido a severas fracturas y enfermedades de los huesos (J. Zhang, Feng, Zhou, Shi, & Wang, 2019).

Los huesos tienen la capacidad de regenerarse gracias a dos células llamadas osteoclastos y osteoblastos, las cuales son las responsables de la resorción ósea y la formación ósea. Por lo tanto, el cuerpo humano puede regenerar el hueso fracturado, sin embargo, cuando el daño al hueso es causado por una enfermedad o una lesión grave, el cuerpo tiene dificultades para regenerar el tejido óseo perdido. Es ahí donde entran los cirujanos y reemplazan el hueso faltante utilizando autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos o biomateriales como polímeros, metales, compositos y ceramicos (Saijo et al., 2016).

Sin embargo, cuando se trata de biomateriales implantados en hueso, los criterios a evaluar son la biocompatibilidad, osteoconductividad, alta porosidad y compatibilidad biomecánica, y ninguno de los biomateriales mencionados anteriormente provee una solución perfecta a la regeneración del hueso, ya que aún existen interrogantes sobre su biocompatibilidad a largo plazo, estabilidad mecánica y biodegradabilidad. Por lo que se han desarrollado nuevas técnicas para producir y diseñar una mejor estructura y material óseo artificial (Q. wei Huang, Wang, & Wang, 2014; Yontar & Gürbüz, 2019).

Actualmente los materiales sustitutos de hueso más destacados corresponden a cerámicas de fosfato de calcio en base a Hidroxiapatita (HAp), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que es una de las formas más estables de fosfato de calcio, su composición química se relaciona con la del mineral óseo, constituye alrededor del 65 a 70 por ciento del hueso, lo que conlleva a una buena biocompatibilidad en

contacto con el hueso (Sadat-Shojai, Khorasani, Dinpanah-Khoshdargi, & Jamshidi, 2013; Szcześ, Hołysz, & Chibowski, 2017).

La gran ventaja de la HAp sintética es la formación de una unión química con el hueso huésped, lo que ha permitido utilizarla como andamio inerte para el relleno de defectos óseos en aplicaciones médicas, o como implantes o prótesis. (Mondal, Pal, & Dey, 2016; Przekora, 2019).

La HAp nanoestructurada juega un papel muy importante en la construcción de tejidos calcificados, pues tiene la capacidad de unir moléculas biológicas como proteínas, que puede utilizarse como materiales funcionales en muchos aspectos, y la capacidad de sintetizar estructuras controladas de apatita para simular la estructura básica del hueso y otros tejidos calcificados. Las partículas biocerámicas nanoestructuradas son de interés en injertos óseos sintéticos y cementos óseos tanto inyectados como controlados, de modo que dichos compuestos refuercen la resistencia de biocerámicos. (Kattimani, Kondaka, & Lingamaneni, 2016)

Una gran diferencia entre la HAp sintética y el mineral del hueso es que la primera posee una alta cristalinidad y ausencia de iones carbonato, lo que conlleva a una biodegradación menor en comparación con los nanocristales del mineral óseo (Ginebra, Espanol, Maazouz, Bergez, & Pastorino, 2018).

En una investigación realizada por el grupo de trabajo del laboratorio de biomateriales y síntesis de nanoestructuras (UAQ), se examinaron los mecanismos de control del crecimiento cristalino de HAp en presencia de aminoácidos con propiedades químicas y estructurales distintas mediante el método hidrotérmico asistido por microondas, se encontró que se pueden obtener diferentes estructuras utilizando aminoácidos como reguladores de crecimiento cristalino, así con el ácido glutámico y ácido aspártico que son aminoácidos ácidos que promueve el crecimiento cristalino de manera preferencial en la dirección $[3\ 0\ 0]$, sin embargo con el uso de Arginina y Alanina que son aminoácidos básicos no se obtuvo una orientación cristalina preferencial (Fonseca, 2018). Por lo que, a partir de esas observaciones, en el presente trabajo se modificó el método de síntesis de HAp

utilizando Arginina como regulador de crecimiento cristalino para obtener una estructura de HAp con alta calidad cristalina y un crecimiento cristalino preferencial.

2. Marco Teórico

2.1 Hueso

El hueso, el material biológico estructural más importante, consiste de fibras de colágeno orgánico en una matriz de fosfato de calcio; debido a que el colágeno es una proteína estructural de alta resistencia a la tracción, forma una subestructura de hélice triple con entrecruzamiento entre las hebras individuales. En la Figura 2.1 se muestra una fibra típica de colágeno.

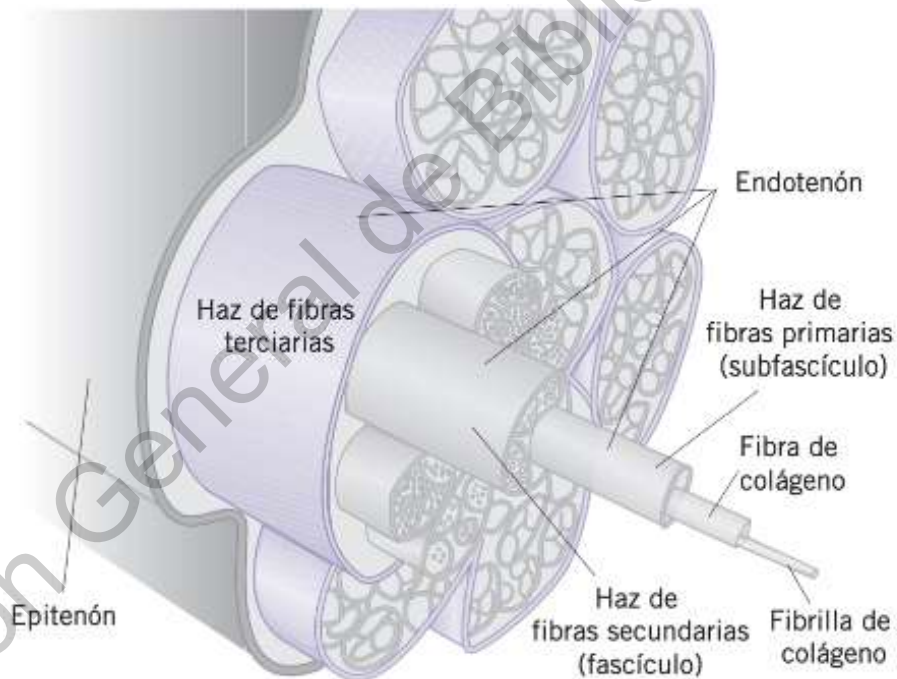


Figura 2.1 Esquema de la fibra de colágeno. Imagen extraída del libro Ciencia de Materiales, Aplicaciones en Ingeniería, Newell pp. 276

Las propiedades de alta resistencia a la compresión y fragilidad del hueso son proporcionadas por la matriz predominante del fosfato de calcio, la cual se forma en una estructura de red cristalina hexagonal que es similar a la hidroxiapatita. Las células óseas son las encargadas de los procesos de producción, reabsorción y reparación de los tejidos del hueso (Newell, 2011). Estas células son:

1. Los **osteoblastos**: células localizadas cerca de la superficie del hueso que producen proteínas estructurales que regulan el crecimiento de los huesos.
2. **Células de alineación ósea**: funcionan como barrera iónica y alinean el hueso.
3. **Osteocitos**: Son células que están atrapadas en la matriz con forma de estrella conectadas mediante canales estrechos que facilitan la transferencia de nutrientes y desechos.
4. **Osteoclastos**: son células destructoras del hueso que migran a áreas específicas, éstas liberan fosfatasa ácida y otros agentes químicos que disuelven la matriz ósea permitiendo que el calcio sea reabsorbido por el cuerpo (Newell, 2011).

Aunque la hidroxiapatita no es lo suficientemente fuerte como para soportar cargas pesadas, al pH del cuerpo es termodinámicamente estable y se adhiere fácilmente a la matriz ósea creciente a través de la osteointegración (Newell, 2011).

2.2 Biomineralización.

El termino biomineralización se refiere a los procesos en los cuales los organismos forman minerales. El control que ejercen los organismos sobre la formación de minerales distingue estos procesos de la mineralización abiótica (Tavafoghi & Cerruti, 2016).

El termino biomineral se refiere no solo a un mineral producido por organismos, sino también al hecho que la mayoría de estos productos mineralizados son materiales de compuestos minerales y orgánicos, que habiendose formado en condiciones controladas, las fases biominerales a menudo tienen propiedades tales como la forma, el tamaño, la cristalinidad, las composiciones isotópicas y de oligoelementos muy diferentes a su contraparte forma inorgánica. La Figura 2.2

muestra esto comparando parte de un solo cristal de calcita formado por un equinodermo con cristales sintéticos únicos de calcita (Weiner, 2003).

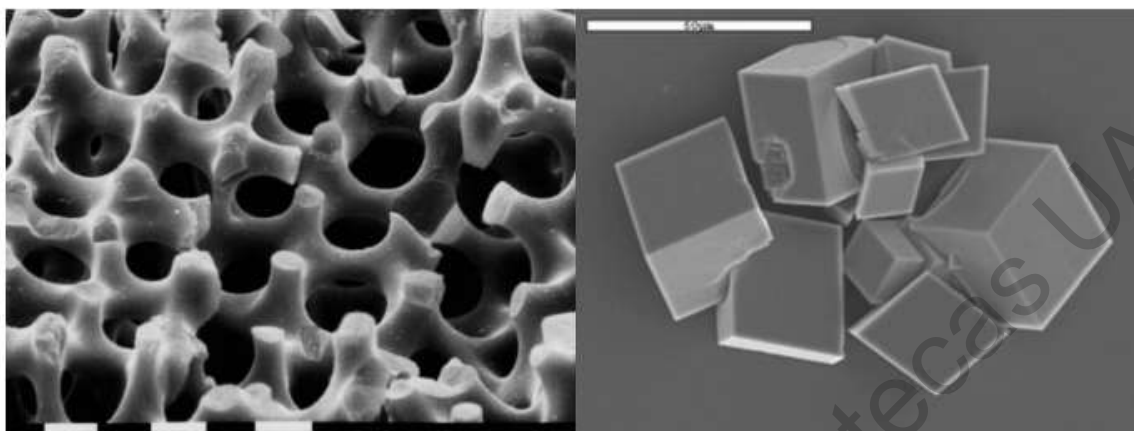


Figura 2.2 Comparación de cristales simples de calcita: (izquierda) estereoma de equinodermo y (derecha) formas romboédricas producidas sintéticamente. Imagen extraída de Weiner, 2003.

2.3 Mecanismo de crecimiento de la Hidroxiapatita.

El crecimiento de la apatita se produce a través de la acumulación de grupos, que se asemeja al crecimiento de los cristales de proteínas macromoleculares, aunque el crecimiento convencional de la nucleación en espiral o bidimensional se produce en la superficie, como en el caso de los cristales de proteínas.

La producción de cristales o materiales amorfos resultantes de las interacciones de sustancias orgánicas e inorgánicas que acompañan a la actividad biológica dentro de los organismos vivos es la biomineralización.

La biomineralización es entonces el proceso por el cual se producen sustancias inorgánicas en plantillas orgánicas dentro de un organismo. Los ejemplos más representativos incluyen la formación de huesos y dientes dentro del cuerpo humano y la formación de espinas y conchas de erizo de mar. Los cristales

individuales de apatita, están dispuestos en el hueso humano y poseen una organización en la que estos cristales individuales de apatita tienen una orientación cristalina alineada. Esta disposición produce una estructura fina que posee una alta resistencia y flexibilidad (Gillams & Jia, 2018).

Aunque la biomineralización puede tener lugar en ambientes de temperaturas y presiones normales, es difícil formar directamente los grupos de cristales inorgánicos que se ven en los tejidos duros como dientes, huesos y conchas a partir de soluciones simples a temperatura y presión normales mientras se mantiene una alta cristalinidad. El mecanismo utilizado por los organismos para construir tejidos necesarios para la supervivencia permite la cristalización con una menor energía de activación. La aplicación de este mecanismo a la cristalización industrial está promoviendo un área de investigación. La cristalización que utiliza procesos de interacción orgánicos-inorgánicos que se genera en ambientes no relacionados con organismos vivos se denomina comúnmente como cristalización “biomimética” ó “basada en biomineralización” (Fonseca, 2018).

Muchos de los cristales formados por biomineralización dentro de los organismos, en especial dentro del cuerpo humano, son sales de calcio, por lo que su formación puede clasificarse genéricamente como calcificación. Los ejemplos beneficios más representativos incluyen la formación de dientes y huesos, mientras que la calcificación perjudicial incluye la formación de calculos, la acumulación de placas ateroscléricas, la calcificación del tejido cerebral y la acumulación de cristales de sal de calcio que a menudo acompañan la presencia de tejidos cancerosos. (An, Leeuwenburgh, Wolke, & Jansen, 2016; Dey, 2020).

Entre las sales de calcio formadas por la biomineralización, los fosfatos de calcio, representados por la apatita, se han estudiado con mucho interés y profundidad. Esto es debido a que las sales de fosfato de calcio no solo son parte integral de la formación de tejidos, sino que también se cree que están involucradas en los procesos de la vida y evolución de las especies. (Vallet & Navarrete, 2016).

La biomineralización es un tema interdisciplinario que tiene relación con la física, la química y la biología (incluida la medicina), y el tema de interés depende de la perspectiva que se tome. Considerándola desde el punto de vista del crecimiento de los cristales, es probable que el punto de interés incluyan los mecanismos de crecimiento de los propios biominerales, la naturaleza de las interacciones orgánico-inorgánicas que son esenciales en el proceso de biomineralización, y el propio ambiente con una composición química compleja con los organismos (An et al., 2016).

El ejemplo más conocido y quizá el más complejo de biomineralización ocurre durante la formación del hueso. Las fibras de colágeno proporcionan una matriz conocida como matriz extracelular (ECM), donde la HAp se nuclea y crece. La nucleación de la HAp se inicia por un conjunto de proteínas no colágenadas (NCPs) fosforiladas cargadas negativamente asociadas con la matriz extracelular. Estas proteínas atraen a los iones de Ca^{2+} y PO_4^{3-} a través de aminoácidos cargados (AAs) y aumentan la sobresaturación local a un nivel suficiente para formar núcleos de un tamaño crítico, que pueden convertirse en cristales de HAp (Tan, Xue, Zhu, Wang, & Xu, 2020; Tavafoghi & Cerruti, 2016). Otro conjunto de NCPs tiene la capacidad de inhibir la formación indeseable de HAp en tejidos como el cartílago y las arterias, continuamente expuestos a fluidos corporales. Estas proteínas inhibitoras están asociadas a la ECM de los tejidos o se encuentran en el plasma y limitan la formación de HAp al unirse a la superficie de los núcleos minerales nacientes, lo que restringe su crecimiento adicional (Tavafoghi & Cerruti, 2016).

2.4 Estructura cristalina de la Hidroxiapatita.

La HAp sintética se presenta en dos formas cristalinas: hexagonal y monoclinica. La HAp hexagonal se forma por la precipitación de soluciones supersaturadas a 25°C - 100°C mientras que la monoclinica se forma a partir de la estructura hexagonal al someterse a altas temperaturas (850°C) y enfriada a

temperatura ambiente (Markovic, Fowler, & Tung, 2004), siendo la hexagonal la forma más frecuentemente encontrada. La unión estructural entre HAp y sustratos orgánicos determina las propiedades elásticas y mecánicas únicas y asombrosas de los tejidos duros (Eliaz & Metoki, 2017).

La forma hexagonal de la HAp tiene una simetría del grupo espacial P63/m, con parámetros de red de $a=b=9.432\text{Å}$, $c=6.881\text{Å}$, y $\gamma=120^\circ$. Esta estructura consiste en un arreglo de tetraedros formados por los grupos PO_4^{3-} , y estos están unidos a los iones de Ca^{2+} intercalados entre ellos. Los iones de Ca^{2+} tienen dos diferentes poliedros de coordinación, los calcio tipo I, están rodeados por nueve átomos de oxígeno, mientras que los iones de calcio tipo II, los rodean sólo siete átomos del mencionado elemento. Los calcio tipo I se encuentran apilados formando columnas a lo largo del eje “c” de la estructura cristalina de la HAp; por su parte, los iones de calcio tipo II están alternados con los tetraedros de los grupos fosfato en el mismo plano (véase Figura 2.3, Figura 2.4 y Figura 2.5) (Campa et al., 2007; Ma & Liu, 2009).

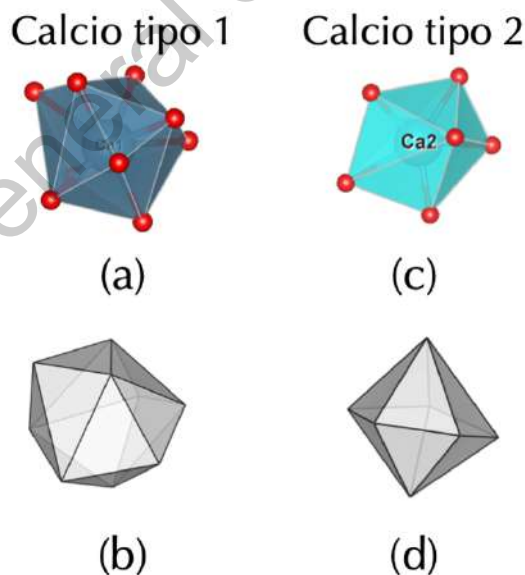


Figura 2.3 Estructura del Calcio tipo I(a,b) y Calcio tipo II(c,d). Modificado de Campa et al., 2007

Los grupos fosfato se encuentran rodeados por 4 átomos de oxígeno, formando un tetraedro (Figura 2.4). Luego, los grupos OH^- se ubican a lo largo de una línea paralela al eje “c” de la estructura cristalina de la HAp, muy cerca del

centro de la estructura, los grupos OH^- adyacentes se encuentran apuntando en direcciones opuestas, formando parte de un arreglo hexagonal de átomos de oxígeno con iones de calcio tipo II ubicados un poco desplazados del centro de los hexágonos. (Izquierda de la Figura 2.5).

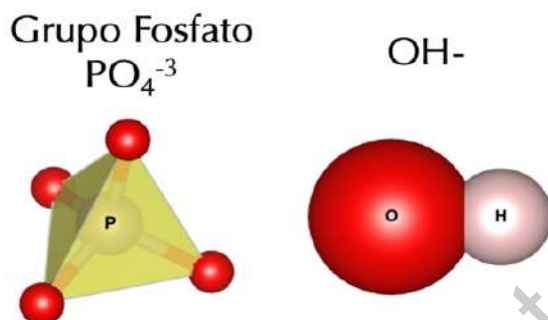


Figura 2.4 Izquierda: Grupo fosfato, Derecho grupo OH^- . Modificado de Campa et al., 2007

Los iones de calcio tipo II forman bipirámides pentagonales al rodearse de los siete átomos de oxígeno, con el vértice de una pirámide sobre el eje del cilindro, donde cuatro de esos átomos de oxígeno están formando el arreglo hexagonal con los grupos OH^- . Como se mencionó estos grupos se encuentran en el eje central del cilindro y los otros dos oxígenos se encuentran fuera del cuerpo del cilindro (centro de la Figura 2.5). Los grupos fosfato PO_4^{3-} se encuentran colocados de tal forma que cada uno de ellos une dos pirámides pentagonales de Ca(II) (derecha de la Figura 2.5) (Alanís, 2015). En la Figura 2.6 se puede observar con mayor claridad esta interacción.

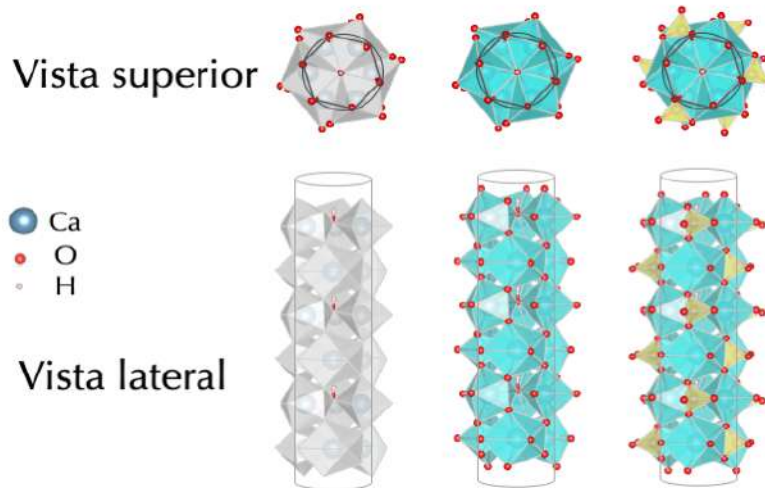


Figura 2.5 Simulación gráfica de la hidroxiapatita. Modificado de Campa et al., 2007.

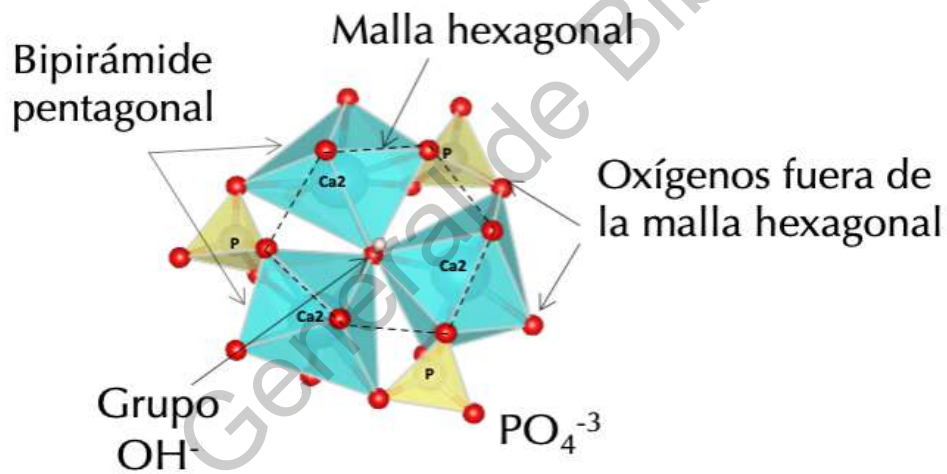


Figura 2.6 Interacción del Ca(II) con el grupo OH^- y los grupos fosfato. Modificado de Campa et al., 2007.

Al rodearse de nueve átomos de oxígeno, los iones de Ca(I) forman un poliedro de coordinación con la forma de prismas triapuntados, los cuales se apilan uno sobre otro compartiendo las caras que son las tapas del prisma trigonal (Figura 2.7).

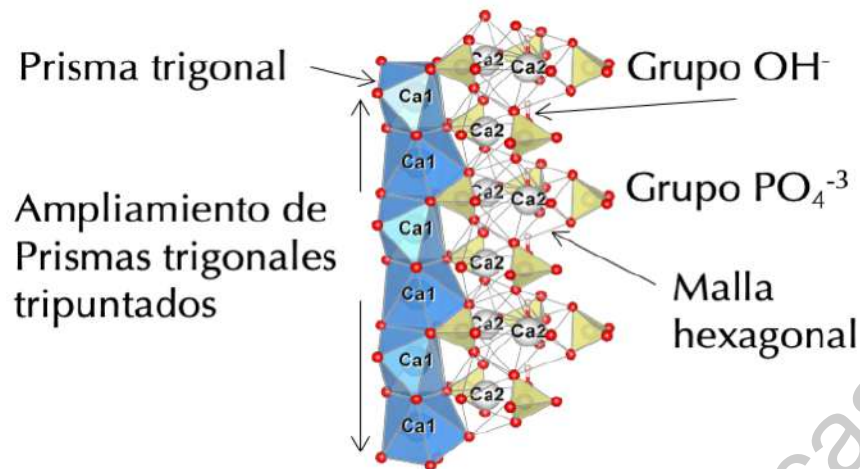


Figura 2.7 Apilamiento de los prismas triangulares tripuntados correspondientes a calcio tipo 1.
Modificado de Campa et al., 2007.

La estructura cristalina de la HAp tiene dos tipos de planos cristalográficos con cargas netas diferentes, cargas positivas en los planos a y b, y cargas negativas en el plano c, respectivamente. Entonces, los planos a y b tienden a atraer las moléculas con carga negativa, como moléculas ácidas, mientras que los planos c prefieren adsorber aquellos con cargas positivas, como moléculas básicas; por lo que el alargamiento de los cristales HAp a lo largo del eje c conduce a un desplazamiento hacia partículas cargadas más positivamente con una especificidad más alta para la adsorción de proteínas ácidas cargadas negativamente. Ya que las entidades biológicas están dispersadas predominantemente en el lado negativo, la HAp cargada positivamente promueve una buena adhesión de las células a la misma, mientras que por el lado contrario sobre las superficies de HAp cargadas negativamente se promueven una adhesión celular y un crecimiento pobres (Uskoković & Uskoković, 2011). Aunque por lo general, los cristales HAp hexagonales que crecen sobre el eje C se obtienen fácilmente en comparación con las superficies “a” y “b” (Lin, Chang, Liu, Chen, & Zhou, 2011).

Se tiene reportado que los planos a y b en la hidroxiapatita son activos para la saliva humana, donde la disolución de PO_4^{3-} y OH^- tiene lugar, de modo que el plano c cubre la superficie de los dientes humanos. Por otro lado, en el relleno óseo

inyectado en partes defectuosas de los huesos, la superficie con un plano “b” puede ser favorable ya que el relleno óseo se debe reemplazar con huesos propios absorbiendo la hidroxiapatita (Inoue et al., 2003). Por lo que se espera que la orientación del cristal se ajuste a la de cada parte cuando se hace uso de la hidroxiapatita como biomaterial en el cuerpo humano.

Dependiendo del tipo de tejido duro, es que los cristales de HAp muestran diferentes orientaciones, como se aprecia en la Figura 2.8. Por ejemplo, en un hueso vivo, el eje “c” de la estructura cristalina de la HAp son paralelos a las fibras de colágeno extendidas, lo que resulta en la exposición de los planos *a,b* en la superficie del hueso. De forma similar, en el esmalte dental, los planos *c* son preferentemente paralelos a la superficie del esmalte, ya que los cristalititos de HAp forman prismas de esmalte que se extienden desde la unión dentino-esmalte (Aizawa, Matsuura, & Zhuang, 2013).

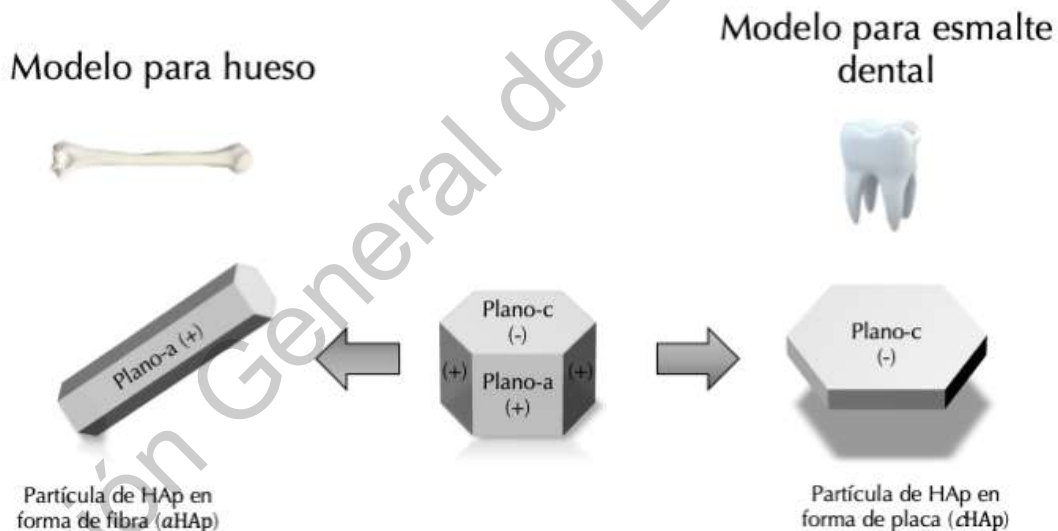


Figura 2.8 Partículas de hidroxiapatita de cristales simples con orientación preferencial en los ejes *a* y *c* como modelos para tejidos duros: hueso y esmalte dental. Modificado de Aizawa et al., 2013.



Se ha reportado que diferentes tipos de proteínas se absorben en diferentes planos de cristales de hidroxiapatita de manera que está relacionada con grupos funcionales en la proteína (Inoue et al., 2003).



Varios estudios han demostrado que las proteínas no colagenadas inhiben en ciertos organismos el crecimiento de la hidroxiapatita en ciertas direcciones acoplándose a las moléculas de HAp en la etapa de nucleación (De Yoreo, Wierzbicki, & Dove, 2007; Inoue et al., 2003). Entonces, se pueden obtener cristales de hidroxiapatita cuyo plano particular se cultive selectivamente mediante un aminoácido.

2.5 Métodos de síntesis.

Daubrée, en 1851, fue el primero en sintetizar apatita al pasar vapor de tricloruro de fósforo sobre cal al rojo vivo, desde entonces han aparecido diversos métodos de preparación de HAp en la literatura (Byrappa & Yoshimura, 2001a). Actualmente existen numerosos métodos para la síntesis de HAp los cuales incluyen precipitación, hidrólisis, sol-gel, sonoquímica, emulsión, combustión, hidrotermal, electrodeposición, etcétera, mediante los cuales se pueden obtener diversas morfologías de nano-HAp. En la Tabla 2.1 se muestran algunas de las diferentes morfologías que pueden obtenerse mediante rutas de síntesis distintas (Huerta, 2018).

Tabla 2.1 Morfologías de HAp mediante diferentes métodos de síntesis (Huerta, 2018).

Morfología	Nombres en la literatura	Intervalo de tamaño	Métodos de síntesis
	Irregular, sin forma	5 nm – 200 µm	Precipitación, hidrólisis, sol-gel, hidrotermal, emulsión, sonoquímica, combustión.
	Esfera, microesfera, nanoesfera	10 nm -100 µm	Precipitación, sol-gel, hidrotermal, emulsión, sonoquímica, combustión.

	Varilla, aguja, tubo, filamento, fibra, alambre, hilo.	Longitud: 10 nm-150 μ m Diámetro: 3 nm – 50 μ m	Precipitación, hidrolisis, sol-gel, hidrotermal, emulsión, sonoquímica, combustión.
	Placa, hojuela, lámina.	Longitud: 40 nm – 50 μ m Anchura: 20 nm – 35 μ m Espesor: 5 nm – 3 μ m	Précipitación, hidrotermal.

Sin embargo, los métodos más sofisticados para la síntesis de HAp son los que se describen en la Tabla 2.2 (Fonseca, 2018) y (Campa, 2007).

Tabla 2.2 Comparación de los métodos más sofisticados para la síntesis de HAp. (Campa et al., 2007)

Técnica	Precursores	Condiciones de síntesis	Observaciones
Síntesis en estado sólido a altas temperaturas	Ca ₃ (PO ₄) ₂ + CaCO ₃ Ca ₂ P ₂ O ₇ + CaCO ₃	900-1300°C con flujo de vapor de agua	Ca/P = 1.67, Gran tamaño de grano, formas irregulares.
Síntesis en fase acuosa	Ca(NO ₃) ₂ + (NH ₄) ₂ HPO ₄ Ca(OH) ₂ + H ₃ PO ₄	100°C pH=7-12	Ca/P < 1.67 cristales irregulares pequeños con baja cristalinidad.

Métodos hidrotérmicos	HAp preparada por vía húmeda, otros fosfatos de calcio, etc.	100-200°C, 1-2MPa 300-600°C, 1-2Kbar	Ca/p < 1.67 cristales irregulares pequeños con baja cristalinidad.
Crecimiento a partir de sales fundidas	Ca ₃ (PO ₄) ₂ y CaF ₂ , o CaCl ₂	1650°C	Cristales grandes, deformaciones durante el crecimiento.
Crecimiento en geles	Gel + Ca ²⁺ + PO ₄ ³⁻	40-60°C pH= 7-10	Se obtiene HAp, OCP, Monetita y Brushita.
Método hidrotermal asistido por microondas	KH ₂ PO ₄ + Ca(NO ₃) ₂ + KOH	100-200°C	Ca/P = 1.67 Cristales homogéneos con alta calidad cristalina.

Komarneni, Roy, and Li (1992) de la Universidad de Pensilvania, estudiaron las diferencias entre la síntesis hidrotermal y la síntesis hidrotermal combinada con microondas; desde entonces se ha utilizado este método para la síntesis de un gran número de materiales de gran interés. Durante los últimos años, se ha demostrado que la cinética de la síntesis química orgánica e inorgánica puede acelerarse significativamente utilizando microondas de 2.45Ghz (Byrappa & Yoshimura, 2001b). La utilización de Microondas, en la síntesis de HAp, como fuente de calentamiento uniforme y controlado, provee un mayor control en la morfología, el tamaño de grano y el crecimiento cristalino, ya que se genera una nucleación rápida y homogénea y se logran controlar todos los parámetros de crecimiento

mencionados, además que reduce drásticamente los tiempos de reacción (Alanís et al., 2016), (Fonseca, 2018).

2.6 Cristalización de soluciones.

La cristalización es un proceso que tiene gran importancia en un rango amplio de disciplinas, en el que se incluyen: física, química, geología, biología y ciencia de materiales (Mann et al., 1993). La cristalización es un proceso químico de formación de cristales sólidos en el que se realiza un cambio de fase, pasando de un estado de desequilibrio a un estado de equilibrio. La cristalización se obtiene mediante una variación en las condiciones de solubilidad del soluto en el disolvente, por oposición a la precipitación debida a una reacción química. (Dimian, Bildea, & Kiss, 2014).

El crecimiento cristalino a partir de una solución ocurre cuando la solución alcanza el punto de sobresaturación (Kramer & van Rosmalen, 2000). El proceso consiste de dos pasos: nucleación y crecimiento cristalino:

- La nucleación se da cuando las moléculas del soluto dispersas en el solvente empiezan a crear cúmulos que se vuelven estables bajo las condiciones actuales de operación. Estos cúmulos estables constituyen los núcleos. Sin embargo, cuando los grupos no son estables, se disuelven. Por lo tanto, para ser núcleos estables, deben alcanzar un tamaño crítico, el cual se dicta por las condiciones de funcionamiento (p. Ej., Temperatura, sobresaturación). En esta etapa los átomos se organizan de manera que se define la estructura cristalina (disposición relativa).
- El crecimiento cristalino es el crecimiento posterior de los núcleos. Tanto la nucleación como el crecimiento ocurren simultáneamente mientras exista una fuerza impulsora de la cristalización, llamada sobresaturación. Esto se puede obtener mediante diferentes métodos como enfriamiento, adición de anti-disolvente, evaporación, ajuste de pH y reacción química.

Dependiendo de las condiciones, puede predominar la nucleación o el crecimiento, y como resultado se obtienen diferentes tamaños y formas. Cuando se agota la sobresaturación, el sistema sólido-líquido alcanza el equilibrio (Dimian et al., 2014)

2.7 Aminoácidos.

El término aminoácido es una abreviatura de ácido α -amino carboxílico (Rogers, 2011). Los aminoácidos son un grupo de moléculas orgánicas que se combinan para formar proteínas, estas consisten de un grupo amino básico (-NH₂) y un grupo carboxílico ácido(-COOH-). Cada molécula está compuesta por un átomo de carbono (C) central, llamado carbono *alfa*, que tiene unidos un grupo amino y un grupo carboxílico (Ouellette & Rawn, 2015) y (Makishima, 2019). También existen los β -aminoácidos, γ -aminoácidos, etc. (Galli, 2012). Figura 2.9 muestra la forma de los α -aminoácidos

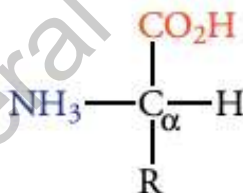


Figura 2.9. Estructura de los aminoácidos(Ouellette & Rawn, 2015)

Los aminoácidos difieren entre sí en la estructura química particular de su grupo "R". Se han identificado más de 500 aminoácidos, algunos de los cuales se encuentran libres en la naturaleza (Moreira, Guerreiro, Brandão, & Sales, 2015), pero solo 20 de ellos constituyen las proteínas de los organismos vivos; 9 de estos aminoácidos no pueden ser sintetizados por los seres humanos (aminoácidos esenciales: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina) por lo que se consumen en la dieta, los otros 11 aminoácidos son sintetizados por el cuerpo humano (aminoácidos no esenciales: arginina,

aspartato, asparagina, alanina, glutamato, glutamina, prolina, tirosina, cisteína, glicina y serina) (Aliu, Kanungo, & Arnold, 2018; Puigserver, 2018).

En la actualidad se utilizan algunos aminoácidos como controladores de crecimiento y orientación cristalina, debido a que estos tienen la función de favorecer o inhibir el crecimiento de la HAp en una dirección determinada, mediante el anclaje con las cargas de los átomos de Ca^{2+} (Fonseca, 2018).

2.7.1 Propiedades de los aminoácidos ácido-base.

Los aminoácidos presentan distintos estados de ionización dependiendo del pH. Cerca de un pH neutro, los aminoácidos libres existen en gran medida como iones dipolares o zwitteriones. Cuando un aminoácido se disuelve en una solución básica, el grupo carboxilato existe como un anión y el ion amonio existe como un grupo amino no protonado; esta especie es la *base conjugada* del aminoácido, y tiene una carga neta de -1. De lo contrario, cuando un aminoácido se disuelve en solución ácida, el grupo carboxilato existe como ácido carboxílico y el grupo amino como ion amonio; esta especie es el *ácido conjugado* del aminoácido original, y tiene una carga neta de +1 (Ouellette & Rawn, 2018). Como se aprecia en la Figura 2.10.

En la Tabla 2.3 Se presentan los puntos isoeléctricos de los 20 aminoácidos importantes para el cuerpo humano.

Tabla 2.3 Punto isoiónico (pI) ó isoeléctrico (pH_i) y polaridad de los 20 aminoácidos esenciales para el cuerpo humano. (Fleck & Petrosyan, 2016; Rogers, 2011)

Aminoácido	Abreviatura	Punto isoiónico (pI) ó isoeléctrico (pH_i)	Polaridad
Ácido Aspártico	Asp D	2.78	Negativo
Ácido Glutámico	Glu E	3.22	Negativo
Arginina	Arg R	10.76	Positivo
Lisina	Lys K	9.74	Positivo
Histidina	His H	7.58	Polar sin carga
Asparagina	Asn N	5.41	Polar sin carga
Glutamina	Gln Q	5.65	Polar sin carga
Serina	Ser S	5.68	Polar sin carga
Treonina	Thr T	6.53	Polar sin carga
Tirosina	Tyr Y	5.65	Polar sin carga
Alanina	Ala A	6.02	No polar
Glicina	Gly G	5.97	No polar
Valina	Val V	5.97	No polar
Leucina	Leu L	5.98	No polar
Isoleucina	Ile I	6.02	No polar
Prolina	Pro P	6.3	No polar
Fenilalanina	Phe F	5.48	No polar
Metionina	Met M	5.75	No polar
Triptofano	Trp W	5.88	No polar
Cisteína	Cys C	5.02	No polar

Los grupos R de los aminoácidos no polares tienen grupos alifáticos o aromáticos que los hace hidrofóbicos; los aminoácidos polares poseen al menos un átomo con pares electrónicos disponibles para la unión de puentes de hidrógeno al agua y otras moléculas. Los dos aminoácidos ácidos tienen un ácido carboxílico en su cadena lateral que les otorga propiedades ácidas (que donan protones). Por otro lado, y siendo de particular interés en este proyecto de tesis, los aminoácidos básicos contienen algún grupo amino en la cadena lateral que, debido a su carácter básico, puede tomar hidrogeniones del medio, dando así la carga eléctrica positiva en comparación con el pH normal que los caracteriza, además de que los tres aminoácidos de este grupo son hidrofílicos, por lo que tienen gran solubilidad en el agua (Rogers, 2011).

Para este proyecto de tesis se utilizó Arginina, que es un aminoácido básico, por lo que es necesario describir un poco este aminoácido.

La arginina se aisló por primera vez del cuerno de una vaca (1895) (Beaumier, Castillo, Yu, Ajami, & Young, 1996), y juega un papel importante en la síntesis de urea en los mamíferos. La arginina se puede extraer por hidrólisis de muchas proteínas comunes, pero es más abundante en protaminas e histonas, que son proteínas asociadas con ácidos nucleicos. La arginina es un aminoácido no esencial para los mamíferos adultos (pueden sintetizarlo a partir del ácido glutámico). El grupo guanidino de la cadena lateral de la arginina es el más básico de todos los grupos R (Figura 2.11).

Grupo guanidino

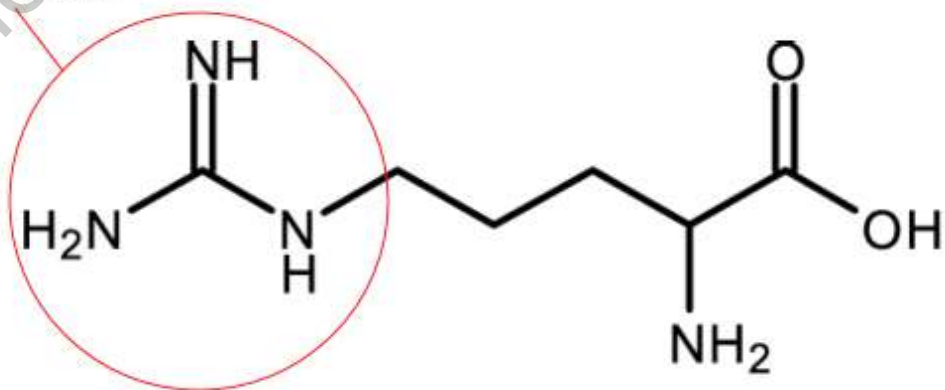


Figura 2.11 Estructura química de el aminoácido L-Arginina con el grupo guanidino.

La principal importancia de la arginina para el crecimiento óseo, radica en que es compatible con la producción de colágeno, componente básico de varios tejidos conectivos (cartílago) y el hueso. Por lo que, la arginina ayuda en el crecimiento de osteoblastos, que es donde se forma la masa ósea (Visser & Hoekman, 1994). En estudios se ha evidenciado que la arginina aumenta el pH y crea condiciones de sobresaturación, de Ca^{2+} y PO_4^{3-} , favorables para la mineralización (X. Huang, Exterkate, & Ten Cate, 2012).

Jogiya et al. (2014) logró sintetizar hidroxapatita utilizando L-arginina como orientador de crecimiento por el método sol-gel y observó una inhibición del crecimiento en términos de reducción en el tamaño promedio de cristalitos y cambios en la morfología de las nano partículas; Luego, Saranya et al. (2018) sintetizó, por el método de sonoquímica, hidroxapatita utilizando L-arginina como modificador de crecimiento cristalino, y demostró que se puede manipular la morfología de la hidroxapatita ajustando cuidadosamente el pH por encima y por debajo del punto isoeléctrico de la arginina. Sin embargo, en estos no se observa una orientación preferencial bien definida; además que no se obtienen cristales homogéneos con alta calidad cristalina, que puede ser debido al método de síntesis.

Por otro lado, Fonseca (2018) que sintetizó hidroxapatita por el método hidrotermal asistido por microondas, utilizando diferentes aminoácidos, obtuvo con arginina una morfología muy homogénea presentando prismas romboidales, pero no logró obtener una orientación cristalina preferencial.

2.8 Aplicaciones de la Hidroxapatita.

Actualmente, la hidroxapatita tiene muchas aplicaciones que son de gran interés sobre todo en las áreas de ortopedia y ortodoncia. La principal aplicación es como un sustituto de tejido óseo, material de relleno de hueso, debido a sus propiedades osteoconductoras (Rameshbabu, Rao, & Kumar, 2005). Otras de las aplicaciones en las que se ha indagado son, debido a sus propiedades catalíticas y

piezoeléctricas, son en remediación ambiental, en inmunosensores, biocombustibles y síntesis de compuestos orgánicos (Rivera et al., 2018).

Las cerámicas a base de fosfato de calcio, como HAp, son de gran interés como sustitutos sintéticos de injerto óseo debido a su bioactividad, osteoconductividad y similitud en composición con el mineral óseo (Pokhrel, 2018).

En los últimos años se han desarrollado diversas investigaciones de gran interés en la impresión 3D de compuestos de polímeros y cerámicos, donde se desarrollaron pruebas in vitro e in vivo de andamios de ingeniería de tejido óseo impresos en 3D, basados en polilactida (PLA)/HAp, policaprolactona (PCL)/ HAp, o poli (fumarato de propileno) (PPF)/ HAp que permiten la cicatrización ósea (Liu et al., 2016; Senatov et al., 2016; Yao et al., 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

Los biomateriales a base de hidroxiapatita sintética han demostrado tener una excelente biocompatibilidad, osteoconductividad y capacidad para promover la regeneración del tejido óseo humano. La HAp sintética, tiene estas propiedades debido a su similitud química y estructural con la HAp natural, que forma parte de la fase inorgánica del tejido óseo. En la HAp natural, algunos iones de calcio son sustituidos por iones de sodio y magnesio, lo cual incrementa su biocompatibilidad; asimismo, esta crece en nuestro organismo con una orientación cristalina preferencial, lo cual la incrementa su resistencia mecánica en compresión y flexión.

Por lo anterior y debido al particular interés de obtener HAp nanoestructurada en forma de nanofibras, en este proyecto se utilizó la técnica de síntesis hidrotermal asistido por microondas, debido a la factibilidad que ofrece para obtener compuestos con una alta cristalinidad, además de la rapidez, facilidad y costo accesible del método; Asimismo, utilizando arginina como una sustancia que dirija y controle el crecimiento cristalino, se puede lograr que la HAp tenga un crecimiento cristalino preferencial, con ello, se logrará un incremento en su resistencia mecánica en compresión de las nanoestructuras, las cuales posteriormente, podrían ser utilizadas para obtener biomateriales para implante de

tejido óseo en una siguiente etapa del proyecto de investigación. La mayor resistencia mecánica de la HAp obtenida con dicho método y la morfología de nanofibra, tendrá un impacto positivo en las propiedades mecánicas del biomaterial de implante óseo, lo que permitirá darle un soporte mecánico al hueso durante su proceso de recuperación.

La arginina es un aminoácido básico, ya que cuenta con dos grupos amina en su estructura molecular y sólo un grupo ácido. Esta característica química permitirá la interacción entre los grupos amina y los iones de calcio de la HAp para lograr un buen control sobre la morfología y crecimiento cristalino preferencial de la HAp.

4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

4.1 Hipotesis.

La Arginina, al ser un aminoácido básico, tiene un mayor número de átomos de nitrógeno en su molécula, los cuales tienen pares de electrones libres que pueden interactuar con los iones de calcio tipo I de la HAp formando uniones covalentes coordinadas. Al formarse este tipo de uniones, las moléculas de arginina funcionan como acarreadores y controlarán la adición de iones de calcio en la estructura cristalina de la HAp en formación. La molécula del aminoácido es capaz de inhibir el crecimiento cristalino de la HAp en algunas direcciones cristalográficas y permitirlo en otras, especialmente en la [001] promoviendo la formación de ciertas morfologías, principalmente la de nanofibras y con un crecimiento cristalino preferencial, logrando también, que dichas fibras crezcan a lo largo del eje "c" de la estructura cristalina de la HAp.

4.2 Objetivos.

4.2.1 Objetivo general.

Sintetizar nanofibras de hidroxiapatita con alta calidad cristalina, pureza y orientación cristalina preferencial, a través del método hidrotérmal asistido por

microondas utilizando arginina como la sustancia que guíe y controle el crecimiento cristalino.

4.2.2 Objetivos específicos.

- Establecer las condiciones óptimas para la reacción de síntesis de las nano fibras de HAp, utilizando el método hidrotermal asistido por microondas.
- Determinar la concentración de arginina en la mezcla de reacción que genere el mejor control en el crecimiento cristalino de la HAp y produzca en ella, una orientación cristalina preferencial.
- Caracterizar las nanofibras de HAp en su estructura cristalina, morfología y composición química (Difracción de rayos X (XRD), Fluorescencia de rayos X (FRX), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y análisis termogravimétrico (TGA)), con la finalidad de entender mejor los resultados y poder emitir las conclusiones acertadas.

5. METODOLOGÍA.

5.1 Síntesis de Hidroxiapatita.

En este trabajo, las muestras de HAp se sintetizaron mediante el método hidrotermal asistido por microondas en un horno de microondas Synthos 3000 de Anton Paar, utilizando el rotor XQ-80 y viales de cuarzo presurizables (Figura 5.1). Se llevaron a cabo síntesis de HAp de 3 muestras distintas, utilizando las mismas concentraciones de precursores, pero variando la concentración del aminoácido arginina. La temperatura interna se mantuvo constante a 170°C, para evitar la evaporación de solvente y mantenerlo en la región subcrítica, la presión se mantuvo elevada y constante a 80 kPa.



Figura 5.1 (izquierda) Microondas Synthos 3000 de anton para y rotores; (derecha) vial de cuarzo presurizable con la tapa y chaqueta protectora

El procedimiento de síntesis de HAp por el método hidrotérmal asistido por microondas se describe en los siguientes pasos:

1. Se prepararon las soluciones de reacción en vasos de precipitado de 500 mL. La primera disolución consistió en Nitrato de Calcio Tetrahidratado [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] (Golden Bell) y el aminoácido L-Arginina [$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$] (Sigma-Aldrich), se utilizaron 250 mL de agua desionizada como medio de reacción a una temperatura de 40°C y agitación vigorosa durante 100 minutos. Se realizaron 3 muestras con concentraciones de L-arginina en una relación molar calcio: arginina de 2:1, 3:1 y 5:1. Cabe mencionar que, al preparar esta solución y tratar de disolver por completo las mencionadas sustancias, se observó que la solución acuosa tenía cierta turbidez, la cual no se perdía incluso prolongando los tiempos de agitación. La turbidez es indicativa de que no se está formando el compuesto quelato entre los átomos de oxígeno o nitrógeno de las moléculas de arginina y los iones de calcio del $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.
2. Se realizó la segunda disolución agregando Fosfato monobásico de Potasio [KH_2PO_4] (J.T. Baker) e Hidroxido de potasio [KOH] (Sigma-Aldrich) en 150 mL de agua desionizada a 40°C y agitación constante durante 20 minutos. Se obtuvieron soluciones homogéneas

3. Posteriormente, se vertieron y mezclaron ambas soluciones en un vaso de precipitado de 500 mL a 40 °C y agitación constante durante 10 minutos. Después, la disolución se colocó dentro de 6 viales de cuarzo con aproximadamente 50 mL de la solución en cada vial, como se muestra en la Figura 5.3. Los viales de cuarzo fueron cerrados herméticamente con tapas especiales de teflón, seguidamente, los viales se introdujeron dentro de unas chaquetas especiales diseñadas para soportar temperaturas altas, luego, se colocaron y sujetaron dentro del rotor XQ-80, finalmente el rotor se colocó dentro de un horno de microondas Synthos 3000 de Anton Para, el cual fue programado para trabajar bajo las siguientes condiciones de reacción; Potencia de 1200 W, presión de 80kPa, temperatura interna de 170 °C, rampa de calentamiento de 15 minutos, un tiempo de reacción de 30 minutos y un tiempo de enfriamiento de 30 minutos mediante un sistema de ventilación y 30 minutos a temperatura ambiente.



Figura 5.2 Viales de cuarzo para rotor XQ80 con mezcla de soluciones

4. Para recuperar las muestras de HAp sintetizada, se filtró el precipitado del fondo de los viales en un papel filtro tipo Whatman grado 1 colocado en un embudo büchner acomodado sobre un matraz kitasato, seguidamente, se realizó un lavado con alcohol isopropílico y agua para eliminar posibles restos de precursores sin reaccionar y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas.

Las muestras en polvo fueron almacenadas en tubos eppendorf para realizar posteriormente las respectivas caracterizaciones (Figura 5.3).



Figura 5.3 Muestra de HAp sintetizada mediante el método hidrotermal asistido por microondas

5.2 Caracterización de la Hidroxiapatita sintética

5.2.1 Difracción de rayos X por polvos (XRD)

El análisis por difracción de rayos X de las muestras de HAp se llevó a cabo del modo siguiente: Se colocó la muestra de HAp en polvo, tomada directamente del final de la reacción de síntesis y sin ninguna molienda previa, en el portamuestras hasta llenarlo al ras y de manera homogénea; posteriormente, se colocó el portamuestras en el difractómetro Ultima IV de Rigaku (Figura 5.4) donde el haz de rayos X incide sobre la muestra. La medición se llevó a cabo bajo las condiciones del equipo a 30KV de voltaje de aceleración y 30 mA de intensidad de corriente, y la muestra se barrió angularmente desde 5 a 80° en 2 theta con saltos de 0.02° y un tiempo de permanencia de 1 segundo en cada salto.



Figura 5.4 Difractómetro de rayos X Ultima IV de Rigaku.

La identificación de las fases cristalinas en las muestras, así como la presencia de la HAp cristalina y posibles orientaciones preferenciales cristalinas, se analizaron con el software MDI JADE versión 5.0, consultando el banco de archivos de difracción de polvos (PDF por sus siglas en inglés) provisto por el Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD por sus siglas en inglés) para identificar y comparar las fases cristalinas presentes en las muestras.

5.2.2 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Para la observación de las muestras en el microscopio electrónico de barrido se utilizó un portamuestras cilíndrico de metal (Cobre, latón, aluminio, etc.), el cual fue pulido y limpiado previamente, utilizando cinta de carbón se adherió la muestra al portamuestras. En la presente tesis, los análisis se realizaron en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6390L utilizando un voltaje de aceleración de 20kV.

5.2.3 Fluorescencia de rayos X (FRX)

Para este proyecto de tesis se realizó el análisis de las muestras en polvos. Las condiciones de operación fueron de un voltaje de 50 kV y una radiación de filamento de plata como excitación, en el equipo Bruker S2 Puma (Figura 5.5)



Figura 5.5 Equipo de fluorescencia de rayos X S2 PUMA de Bruker.

5.2.4 Análisis Termogravimétrico(TGA)

La muestra se coloca dentro del portamuestras, y se sitúa en contacto con sensor de temperatura. Se coloca dentro del horno a una atmósfera completamente controlada. La temperatura del horno se controla y se programa por medio de un controlador de temperatura que dispone el equipo. Los datos son recogidos por el

sensor de temperatura y la información sobre la pérdida de masa es procesada por el sistema, el cual muestra los resultados en el monitor del ordenador en forma de una curva termogravimétrica.

Para este análisis se utilizó un TGA Q500 TA Instruments con portamuestras de platino y utilizando una atmósfera de N_2 con flujo de 60 ml/min, aplicando calor hasta llegar a una temperatura de 1000 °C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Para cada análisis se utilizaron 5mg de muestra aproximadamente.



Figura 5.6 TGA Q500 TA Instruments.

6. RESULTADOS

6.1 Difracción de rayos X por polvos (XRD)

Los resultados de las muestras analizadas por XRD confirman la obtención de cristales de HAp sintética. En todas las muestras se encontró una sola fase cristalina presente, la cual se identificó por comparación utilizando la base de datos de PDF's. La fase cristalina obtenida de HAp en las muestras corresponde al PDF 09-0432. El hecho de haber obtenido una sola fase cristalina es indicativo de la pureza de las muestras sintetizadas a través del método hidrotérmal asistido por microondas.

La Figura 6.1 muestra un difractograma típico de HAp con estructura cristalina hexagonal y crecimiento aleatorio, ya que la muestra, fue sintetizada sin utilizar una sustancia para guiar su crecimiento cristalino. En el difractograma se observan las reflexiones de Bragg características de esta fase cristalina de HAp y sobre ellas se colocaron sus respectivos índices de Miller.

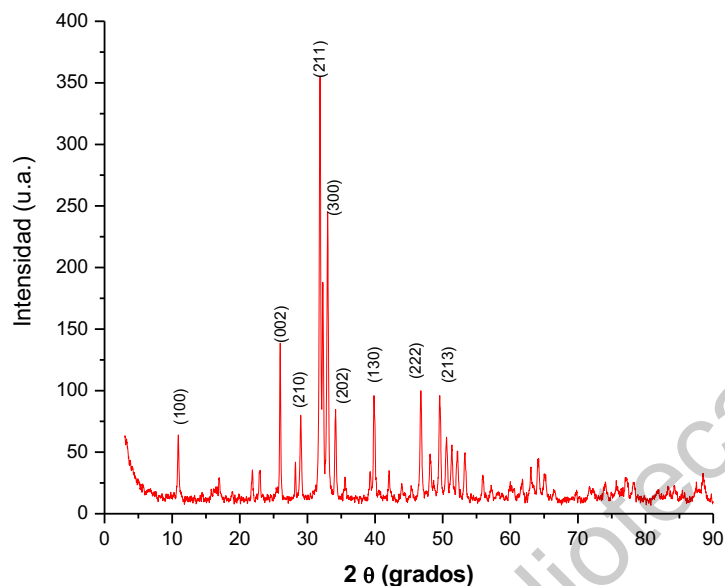


Figura 6.1 Difractograma típico de una muestra de HAp hexagonal con crecimiento cristalino aleatorio.

En las Figuras Figura 6.2, Figura 6.3 y Figura 6.4 se observan los difractogramas de las muestras obtenidas de las reacciones de síntesis de HAp a través del método hidrotermal asistido por microondas, controlando el crecimiento de los cristales mediante la adición del aminoácido L-Arginina con relaciones de molares L-Arginina: Ca^{2+} en las muestras 2:1, 3:1 y 5:1 respectivamente. En estas muestras no se observó una orientación cristalina preferencial tan marcada como aquella obtenida para la HAp sintetizada utilizando ácido Glutámico para controlar el crecimiento cristalino (Alanís et al., 2016).

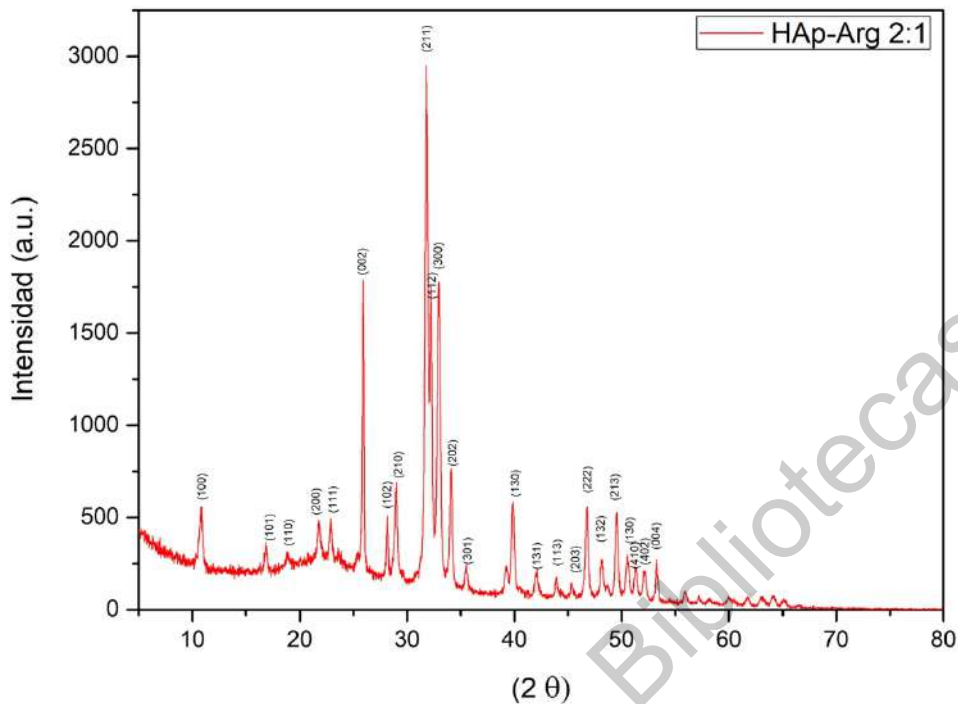


Figura 6.2 Difractograma típico de HAp sintetizada con una relación molar de arginina: calcio de 2:1

En la Figura 6.2 se puede observar que la reflexión de Bragg correspondiente a los planos (211) ubicada alrededor de 31.8° en 2θ es la más intensa, y está de acuerdo a lo establecido en el PDF 09-0432. Pero este difractograma contrasta con el mostrado en la Figura 6.1 en la intensidad de las reflexiones de Bragg correspondientes a los planos (002), (112) y (300), las cuales tienen intensidades similares de 62.82, 58.7 y 60.25% respectivamente, en relación a la intensidad correspondiente al (211). Según el mencionado PDF, la intensidad para el (002) debería ser de 43.5%, para el (112) de 65% y para el (300) de 76.2%. Lo anterior nos está indicando que la muestra tiene una ligera orientación preferencial en (002).

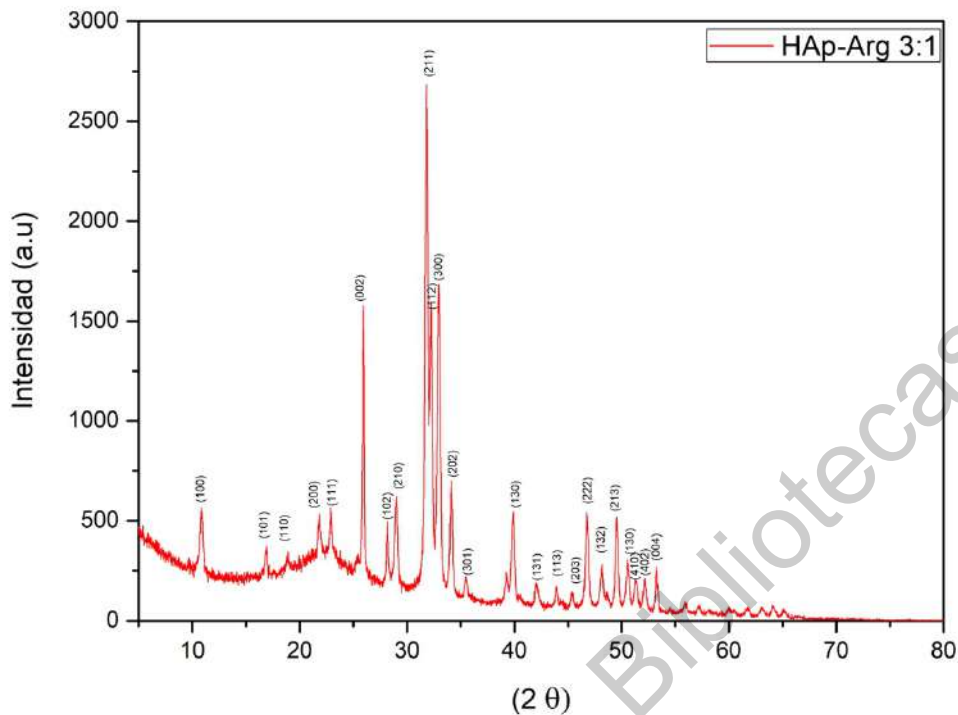


Figura 6.3 Difractograma de HAp sintetizada con una relación molar de arginina: calcio de 3:1

En la Figura 6.3 se observa un difractograma típico de las muestras de HAp sintetizadas con una relación molar Arginina: Calcio de 3:1, y una vez más se ve que la reflexión de Bragg correspondiente a los planos (211) es la más intensa. Las reflexiones correspondientes a (112) y (300) casi no variaron en intensidad, pero la reflexión de Bragg de los planos (002) disminuyó ligeramente de intensidad, llegando a un 57.7% respecto a la intensidad del (211). Lo anterior nos indica, que un aumento en la concentración de arginina resulta en una disminución en la orientación preferencial de la HAp obtenida.

La Figura 6.4 nos muestra un difractograma típico de una muestra de HAp sintetizada utilizando una relación molar Arginina:Calcio de 5:1. Una vez más la reflexión de Bragg correspondiente a los planos (211) fue la más intensa. En esta ocasión, se observó que la intensidad de la reflexión de Bragg para los planos (002) volvió a disminuir, llegando a ser igual a la registrada en el PDF 09-0432, de 43.5% respecto a la del (211). Un aumento en la concentración de arginina condujo a una

reducción de la intensidad de los planos (002), lo que representó la pérdida de la orientación preferencial.

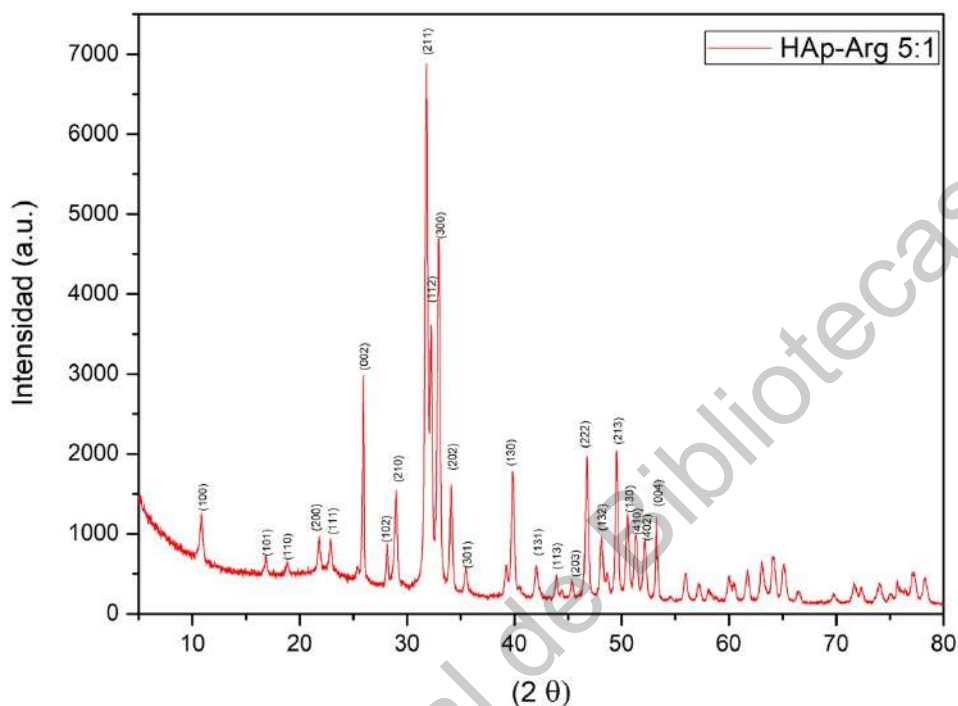


Figura 6.4 Difractograma de HAp sintetizada con una relación molar de arginina: calcio de 5:1

6.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las observaciones a través del SEM permitieron ver la morfología presente en la HAp sintetizada por las diferentes reacciones y empleando diferentes concentraciones de arginina para controlar el crecimiento cristalino. En la Figura 6.5 aparecen dos micrografías de la muestra de HAp sintetizada utilizando una relación molar arginina: calcio de 2:1. De inmediato se puede ver que la morfología para esta HAp es notoriamente diferente a la reportada por Alanís, en donde se utilizó ácido glutámico para guiar el crecimiento cristalino (Alanís et al., 2016).

Se puede observar con claridad que hay dos morfologías presentes en la muestra, una de fibras delgadas y cortas con dimensiones de entre 60 y 90 nm de diámetro, y decenas de micras de largo, y otra más de pequeñas placas o partículas conglomeradas de entre 300 y 400 nm. Tomando en cuenta este resultado y el de XRD para esta muestra, es posible suponer que las fibras tengan la orientación preferencial en la (002) y las pequeñas placas no tengan una orientación preferencial. Al estar mezcladas estas dos morfologías y ser analizadas al difractor de rayos X, se sumarían los difractogramas correspondientes a cada morfología y podría dar como resultado los difractogramas típicos para esta muestra como el que aparece en la Figura 6.4. La orientación preferencial en las fibras no es tan evidente como se esperaba debido a que las placas contribuyen con un difractograma sin orientación preferencial, lo cual reduce la intensidad de las reflexiones de Bragg para las fibras.

Al incrementar la relación molar arginina: calcio a 3:1, en la muestra comenzaron a formarse algunas nano-esferas de HAp, como se puede ver en la Figura 6.6. En la literatura hay varios reportes de que estas nano-esferas crecieron sin ninguna orientación cristalina preferencial (Moreno et al., 2020; Stastna, Castkova, & Rahel, 2020; H. Zhang & Zhu, 2009), y por ello, la intensidad de las reflexiones de Bragg que den evidencia de una orientación preferencial se ven opacadas por las respectivas intensidades de las reflexiones de la HAp crecida al azar.

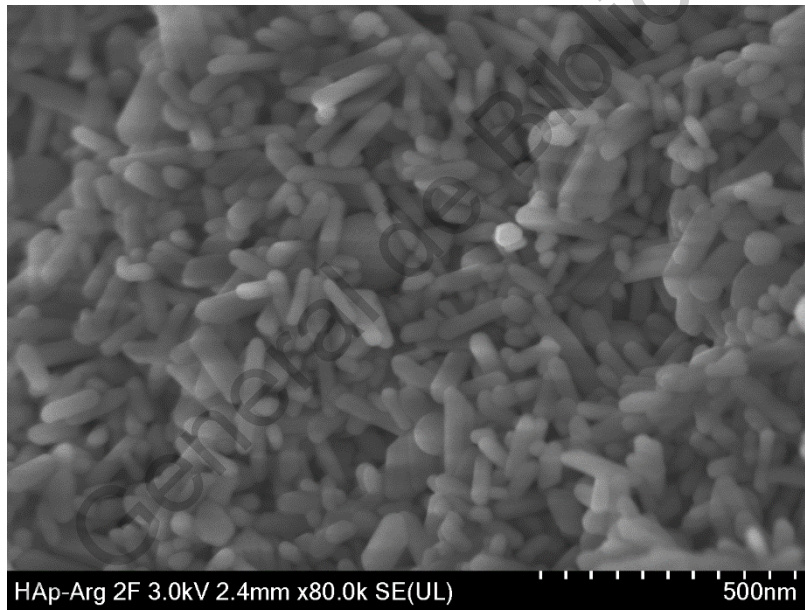
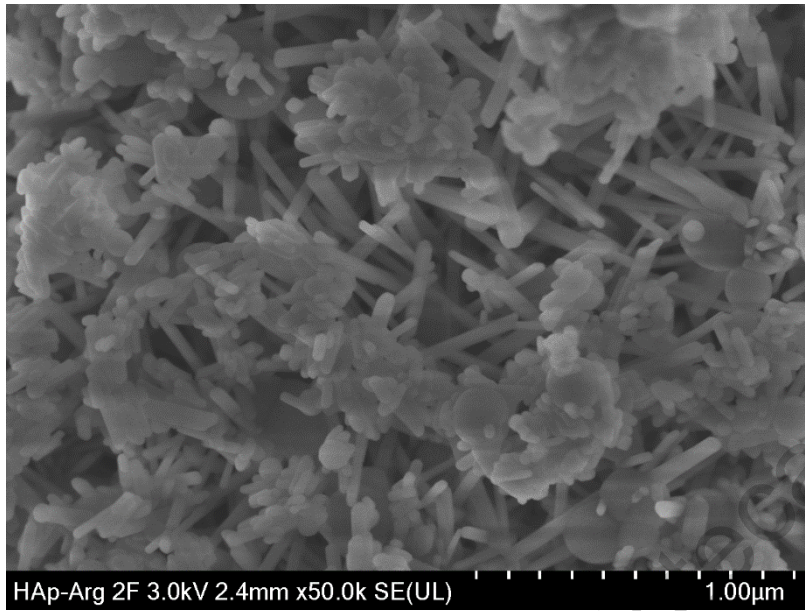


Figura 6.5 Micrografías de la muestra de HAp sintetizada utilizando una relación molar arginina: calcio de 2:1.

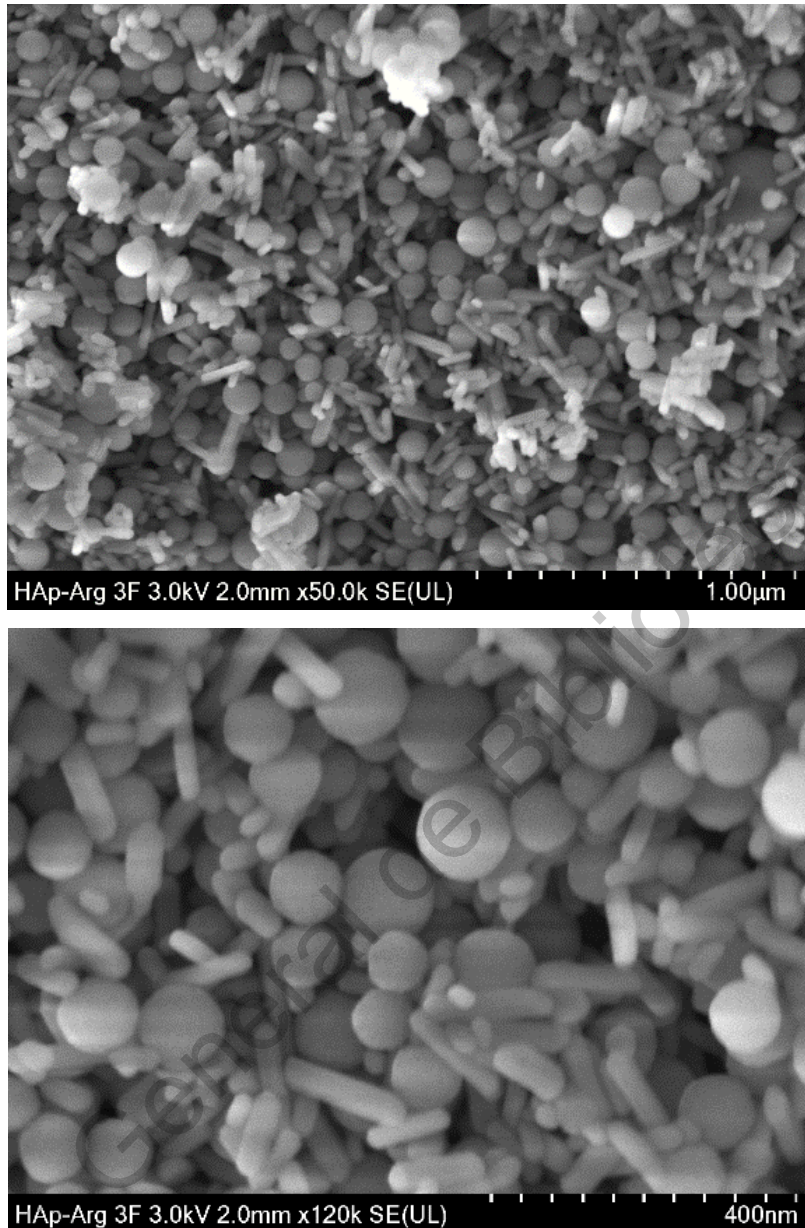


Figura 6.6 micrografías de SEM de la muestra de HAp sintetizada con una relación molar arginina: calcio de 3:1.

Al incrementar nuevamente la concentración de arginina hasta llegar a una relación molar de 5:1, incrementó el número de placas y las esferas crecieron en tamaño, superando algunas de ellas los 300 nm de diámetro, como se puede ver en la Figura 6.7. Aún se observa un número alto de fibras en la muestra, pero es posible que su orientación preferencial ya no sea notoria en un difractograma de rayos X debido a la presencia de las placas y las esferas de HAp.

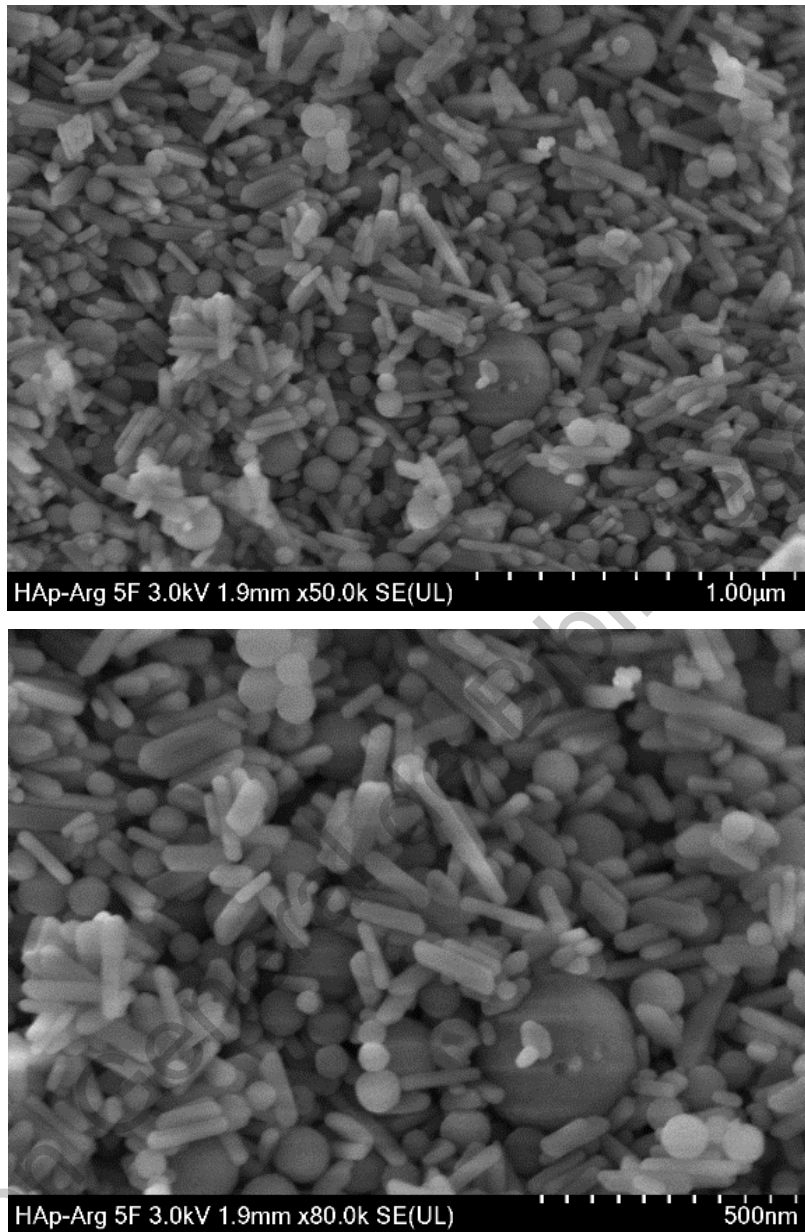


Figura 6.7 Micrografías de SEM de la muestra de HAp obtenida utilizando una relación molar arginina: calcio de 5:1.

6.3 Florescencia de Rayos X

La composición elemental de las muestras de HAp es fundamental para su biocompatibilidad. La relación Ca/P estequiométrica en la HAp es de 1.67, pero en el tejido óseo humano, puede tener esta relación elemental en el intervalo de 1.5 a 1.8 (Driessens et al., 2002).

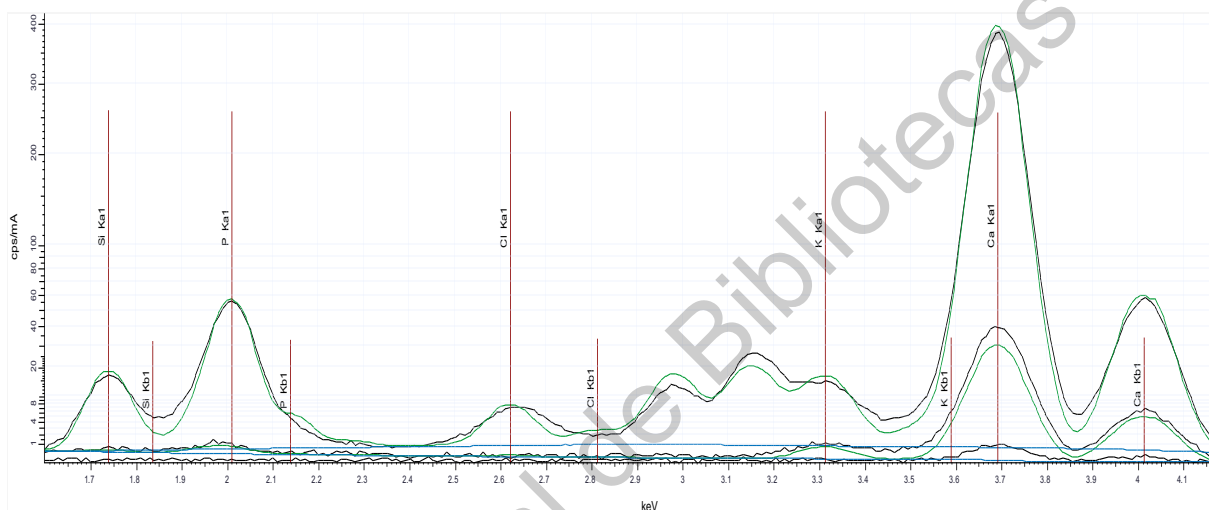


Figura 6.8 Espectro representativo de un análisis XRF de una muestra de HAp.

Se llevaron a cabo análisis elementales a todas las muestras de HAp obtenidas en este trabajo. En la Figura 6.8 se muestra un espectro típico de una muestra de HAp obtenida en este trabajo. En la Tabla 6.1 se muestran los porcentajes en peso de los elementos presentes en las muestras de HAp sintética. Los elementos detectados fueron calcio, fósforo, oxígeno y silicio; también, se muestran las relaciones de Ca/P calculadas. Cabe mencionar que el silicio presente en las muestras es una impureza que se generó durante reacciones de síntesis de HAp llevadas a cabo previamente, en las que se utilizó un ionomero de vidrio rico en sílice, cuyos residuos quedaron adheridos a las paredes internas de los tubos de cuarzo utilizados en las reacciones de síntesis de la HAp obtenida en este trabajo.

Tabla 6.1 Porcentaje elemental, relaciones Ca/P en peso y atómicas de las diferentes muestras de HAp cuantificadas mediante la técnica de XRF.

Muestras	HAp 2:1		HAp 3:1		HAp 5:1	
	% peso	% atómico	% peso	% atómico	% peso	% atómico
<i>Ca</i>	31.71%	17.38%	29.07%	15.81%	32.70%	17.96%
<i>P</i>	5.98%	4.23%	5.82%	4.09%	6.61%	4.70%
<i>O</i>	50.31%	69.00%	50.50%	68.76%	50.27%	69.17%
<i>Si</i>	12.00%	9.38%	14.61%	11.34%	10.42%	8.17%
<i>Relación Ca/P</i>	5.30%	4.07%	4.99%	3.84%	4.94%	3.80%

La cantidad de silicio detectado en las muestras es muy alta y es evidente que también fue muy alta la cantidad de oxígeno debido a la presencia de la sílice, y esto afectó mucho a la relación de calcio: fósforo esperada.

El hallazgo de este resultado de la composición elemental, permite entender de mejor forma los resultados obtenidos por difracción de rayos X (XRD) y microscopía electrónica de Barrido (SEM). De las mencionadas síntesis previas de HAp utilizando el ionómero de vidrio para controlar la reacción de síntesis, se pudo encontrar por medio de XRD que la HAp obtenida no presentaba ninguna orientación preferencial y las observaciones a través de SEM mostraron la obtención de partículas tendientes a ser esféricas, muy similares a las observadas en las Figura 6.6 y Figura 6.7 del presente trabajo.

En base a lo anterior, podemos suponer que la presencia de los residuos del ionómero de vidrio, favorecieron a la formación de las nanoesferas de HAp, y esta morfología compitió con las fibras de HAp formadas por la presencia de la arginina.

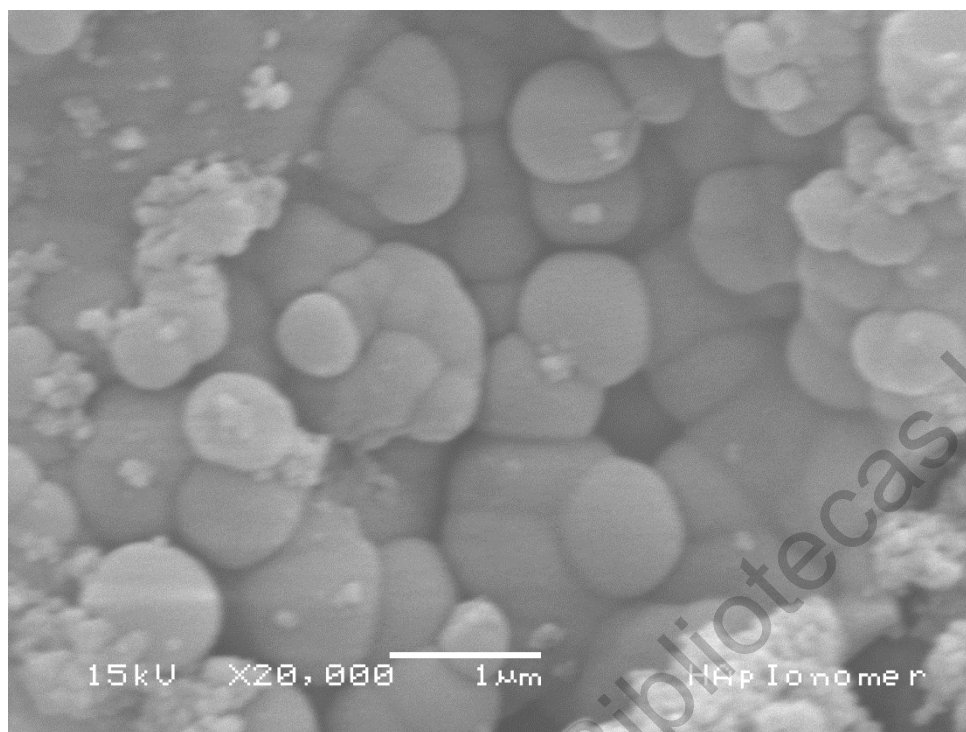


Figura 6.9 micrografía de SEM típica de la HAp obtenida utilizando ionomero de vidrio para controlar el crecimiento cristalino.

6.4 Análisis Termogravimétrico (TGA)

Se realizaron análisis termogravimétricos para determinar la pureza y estabilidad térmica de las muestras de HAp sintetizada mediante el método hidrotermal asistido por microondas.

En las Figuras Figura 6.10, Figura 6.11 y Figura 6.12 se presentan los resultados de estos análisis por TGA realizados a las muestras con diferente relación molar arginina: calcio de 2:1, 3:1 y 5:1, respectivamente.

Las tres muestras presentaron una pérdida de masa de alrededor del 1.5% en la zona de 0-200° C, que se adjudica a la pérdida de agua adsorbida en las muestras. Es importante mencionar que la síntesis se realizó a temperatura de 170° C, por lo que el aminoácido no se vio afectado a esa temperatura. La etapa de degradación del aminoácido comienza después de los 200° C, lo cual coincide con lo reportado por (Dunn, 1932).

Las muestras presentan pérdidas de masa de entre 1.5 a 2% en el intervalo de temperatura de los 200° C a los 600°C, es posible que a esta temperatura los residuos orgánicos de la síntesis, como la misma arginina se descompongan en este intervalo de temperatura. La arginina se mantiene adherida a la superficie de las fibras de HAp, y finalmente se degrada por la acción térmica. La última etapa observada en la pérdida de masa de la HAp obtenida comenzó alrededor de los 700°C, y puede deberse a la transformación de la misma a otras fases cristalinas como la Whitlockita.

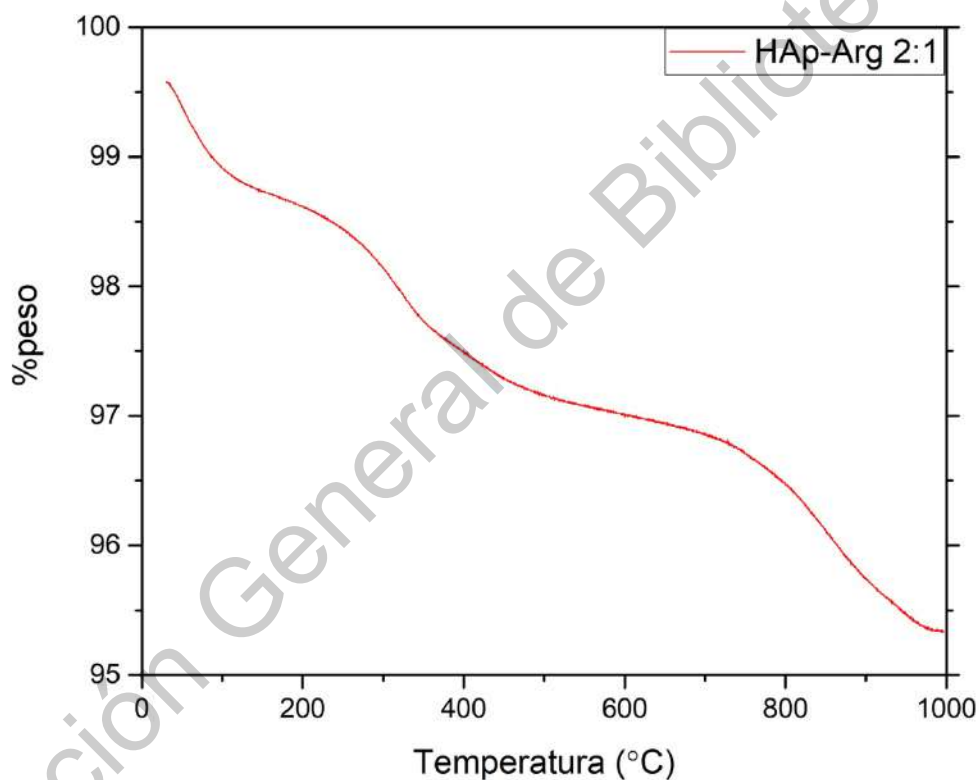


Figura 6.10 Análisis TGA para la Hidroxiapatita sintetizada con una relación molar de arginina: Calcio 2:1

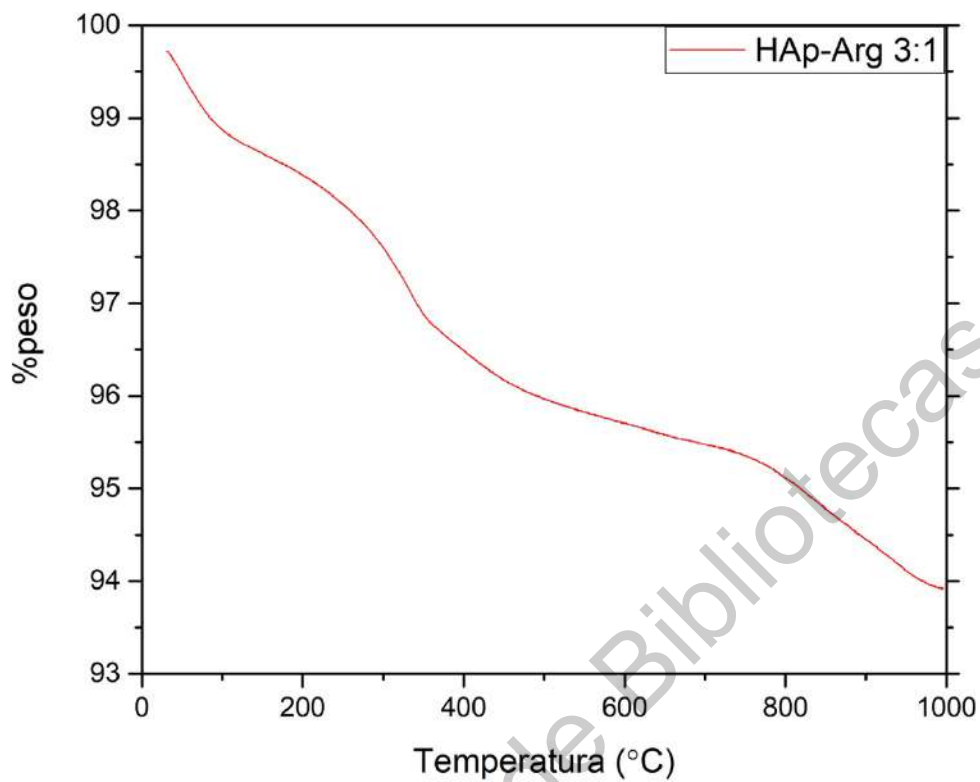


Figura 6.11 Análisis TGA para la Hidroxiapatita sintetizada con una relación molar de arginina: calcio 3:1

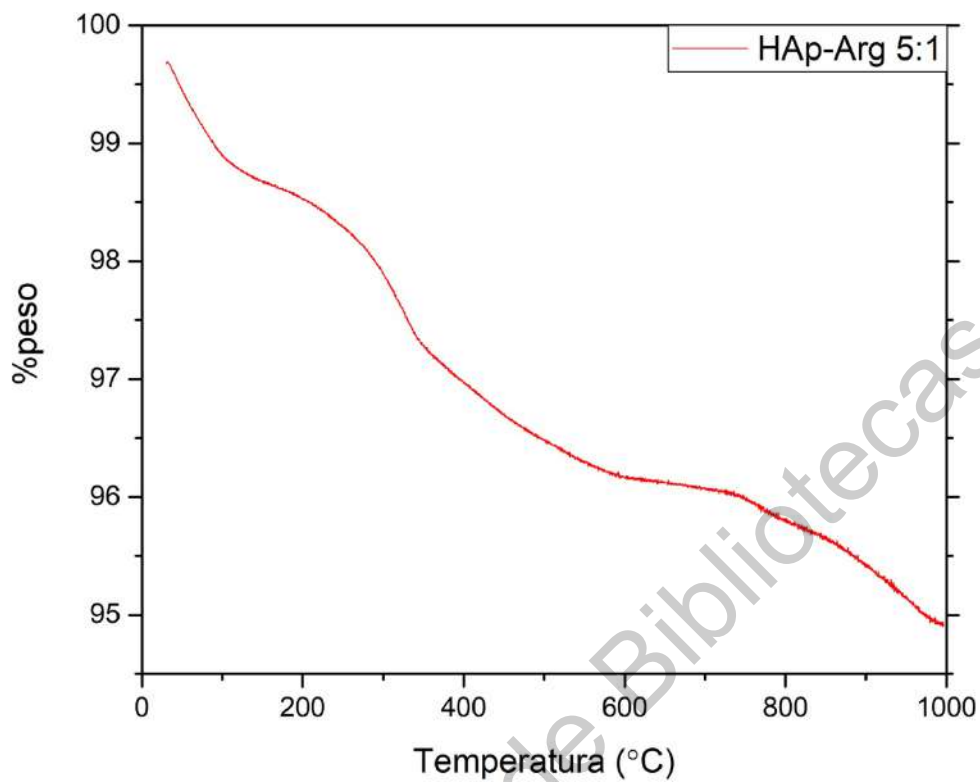


Figura 6.12 Análisis TGA para la Hidroxiapatita sintetizada con una relación molar de arginina: calcio 5:1

7. Conclusiones

Basados en los resultados experimentales mostrados en este trabajo, se puede concluir que se logró la síntesis de la HAp por el método hidrotérmal asistido por microondas, y el uso de la arginina para controlar el crecimiento cristalino, permitió que se obtuviera una morfología de nanofibra con 80 nm de diámetro promedio. Otras morfologías estuvieron presentes en las muestras, una de ellas fueron las nanoesferas, las cuales se favoreció su crecimiento debido a la contaminación por sílice en la superficie de los tubos de cuarzo en donde se llevó a cabo las reacciones de síntesis.

Al parecer, mayores concentraciones de arginina favorecen la formación de placas. Este resultado es similar al encontrado por J.L Cabrera en 2011, en donde encontró que una concentración baja de ácido glutámico producía nanofibras de HAp, pero si se incrementa la concentración del mencionado aminoácido, la morfología más favorable es la de nanoplacas.

En una etapa posterior a esta investigación, se utilizarán menores contenidos de arginina a los utilizados en este trabajo y se eliminará por completo la presencia de la sílice, utilizando para las reacciones de síntesis de la HAp tubos de cuarzo completamente nuevos.

Como perspectivas de trabajo futuro, las nanofibras obtenidas podrán ser utilizadas para la fabricación de nanobiomateriales, ó materiales aplicables en limpieza del medio ambiente para capturar metales pesados del agua y del aire.

8. Referencias

- Aizawa, M., Matsuura, T., & Zhuang, Z. (2013). Syntheses of Single-Crystal Apatite Particles with Preferred Orientation to the a- and c-Axes as Models of Hard Tissue and Their Applications. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(11), 1654–1661. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00439>
- Alanís, J. R. (2015). *Obtención de un material compuesto orgánico-inorgánico con porosidad controlada para su aplicación en prótesis de Tejido Óseo (Tesis de maestría)*. Recuperado de <http://ri.uaq.mx/xmlui/handle/123456789/5184?locale-attribute=en>
- Alanís, J. R., Rivera, E. M., Cervantes, J. S., Almanza, H., Nava, R., Cortes, C., & Velázquez, R. (2016). Synthesis of Micro and Nano-Sized Hydroxyapatite Fibers Through the Microwave Assisted Hydrothermal Method. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(7), 7557–7566. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.12829>
- Aliu, E., Kanungo, S., & Arnold, G. L. (2018). Amino acid disorders. *Annals of Translational Medicine*, 6(24), 471–471. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.12.12>
- An, J., Leeuwenburgh, S., Wolke, J., & Jansen, J. (2016). Mineralization Processes in Hard Tissue: Bone. En *Biom mineralization and Biomaterials: Fundamentals and Applications* (pp. 129–146). <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-338-6.00005-3>
- Beaumier, L., Castillo, L., Yu, Y. M., Ajami, A. M., & Young, V. R. (1996). Arginine: New and Exciting Developments for an “Old” Amino Acid. *Biomedical and Environmental Sciences*, 9(2–3), 296–315.
- Brower, P. (2010). *Teoría de FRX: Familiarizándose con los principios* (1ra ed.). Panalytical B.V.
- Byrappa, K., & Yoshimura, M. (2001a). Hydrothermal Growth of Some Selected Crystals. En *Handbook of Hydrothermal Technology* (pp. 198–314).

<https://doi.org/10.1016/b978-081551445-9.50006-4>

Byrappa, K., & Yoshimura, M. (2001b). Hydrothermal Processing of Materials. En *Handbook of Hydrothermal Technology* (pp. 754–II). <https://doi.org/10.1016/b978-081551445-9.50011-8>

Cabrera, J. L., Velázquez-Castillo, R., & Rivera-Munoz, E. M. (2011). Synthesis of hydroxyapatite nanostructures using microwave heating. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11(6), 5555–5561. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.3433>

Campa, J., Ulloa, G., Bucio, L., A Belio, I., Velazquez, R., & Rivera Muñoz, E. M. (2007). *Biomateriales. Fundamentos, Técnicas y Aplicaciones*. (Primera). Guadalajara: Universidad de Guadalajara.

De Yoreo, J. J., Wierzbicki, A., & Dove, P. M. (2007). New insights into mechanisms of biomolecular control on growth of inorganic crystals. *CrystEngComm*, 9(12), 1144. <https://doi.org/10.1039/b713006f>

Dey, P. (2020). Bone Mineralisation. En *Contemporary Topics about Phosphorus in Biology and Materials*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92065>

Dimian, A. C., Bildea, C. S., & Kiss, A. A. (2014). Batch Processes. En *Computer Aided Chemical Engineering* (Vol. 35, pp. 449–488). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62700-1.00011-5>

Driessens, F. C. M., Boltong, M. G., De Maeyer, E. A. P., Wenz, R., Nies, B., & Planell, J. A. (2002). The Ca/P range of nanoapatitic calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 23(19), 4011–4017. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00151-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00151-5)

Dunn, M. S., & Brophy, T. W. (1932). *DECOMPOSITION POINTS OF THE AMINO ACIDS*. Recuperado de <http://www.jbc.org/>

Eliasz, N., & Metoki, N. (2017). Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications.

Materials, 10(4). <https://doi.org/10.3390/ma10040334>

Fleck, M., & Petrosyan, A. M. (2016). *Salts of amino acids : crystallization, structure and properties*.

Fonseca, O. (2018). *Estudio de crecimiento cristalino de Hidroxiapatita sintética regulada por distintos aminoácidos*. Universidad Autonoma de Querétaro.

Galli, F. (2012). Amino acid and protein modification by oxygen and nitrogen species. *Amino Acids*, 42(1), 1–4. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0670-8>

Gillams, R. J., & Jia, T. Z. (2018, junio 1). Mineral surface-templated self-assembling systems: Case studies from nanoscience and surface science towards origins of life research. *Life*, Vol. 8. <https://doi.org/10.3390/life8020010>

Ginebra, M.-P., Espanol, M., Maazouz, Y., Bergez, V., & Pastorino, D. (2018). Bioceramics and bone healing. *EFORT Open Reviews*, 3(5), 173–183. <https://doi.org/10.1302/2058-5241.3.170056>

Huang, Q. wei, Wang, L. ping, & Wang, J. ye. (2014). Mechanical properties of artificial materials for bone repair. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Science)*, 19(6), 675–680. <https://doi.org/10.1007/s12204-014-1565-8>

Huang, X., Exterkate, R. A. M., & Ten Cate, J. M. (2012). Factors associated with alkali production from arginine in dental biofilms. *Journal of Dental Research*, 91(12), 1130–1134. <https://doi.org/10.1177/0022034512461652>

Huerta, V. J. (2018). *Recristalización de nanocintas de hidroxiapatita inducida por campos eléctricos* (Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE)). Recuperado de https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/2060/1/Tesis_Huerta_Guerra_%2896%29.pdf

Inoue, K., Sassa, K., Yokogawa, Y., Sakka, Y., Okido, M., & Asai, S. (2003). Control of Crystal Orientation of Hydroxyapatite by Imposition of a High Magnetic Field. *MATERIALS TRANSACTIONS*, 44(6), 1133–1137.

<https://doi.org/10.2320/matertrans.44.1133>

Jogiya, B. V, Rathod, K. R., Tank, K. P., Parekh, B. B., & Joshi, M. J. (2014). Synthesis and Characterization of Arginine modified Nano Hydroxyapatite. En *International Journal of ChemTech Research CODEN* (Vol. 6).

Kattimani, V. S., Kondaka, S., & Lingamaneni, K. P. (2016). Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration. *Bone and Tissue Regeneration Insights*, 7, BTRI.S36138. <https://doi.org/10.4137/btri.s36138>

Komarneni, S., Roy, R., & Li, Q. H. (1992). Microwave-hydrothermal synthesis of ceramic powders. *Materials Research Bulletin*, 27(12), 1393–1405. [https://doi.org/10.1016/0025-5408\(92\)90004-J](https://doi.org/10.1016/0025-5408(92)90004-J)

Kramer, H. J. M., & van Rosmalen, G. M. (2000). CRYSTALLIZATION. 64–84. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/00031-4>

Lin, K., Chang, J., Liu, X., Chen, L., & Zhou, Y. (2011). Synthesis of element-substituted hydroxyapatite with controllable morphology and chemical composition using calcium silicate as precursor. *CrystEngComm*, 13(15), 4850. <https://doi.org/10.1039/c0ce00835d>

Liu, A., Xue, G. H., Sun, M., Shao, H. F., Ma, C. Y., Gao, Q., ... He, Y. (2016). 3D Printing Surgical Implants at the clinic: A Experimental Study on Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *Scientific Reports*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep21704>

Ma, G., & Liu, X. Y. (2009). Hydroxyapatite: Hexagonal or Monoclinic? *Crystal Growth & Design*, 9(7), 2991–2994. <https://doi.org/10.1021/cg900156w>

Makishima, A. (2019). Fundamental Knowledges and Techniques in Biochemistry. En *Biochemistry for Materials Science* (pp. 35–51). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817054-0.00002-3>

Mann, S., Archibald, D. D., Didymus, J. M., Douglas, T., Heywood, B. R., Meldrum, F. C., & Reeves, N. J. (1993). Crystallization at inorganic-organic interfaces:

Biominerals and biomimetic synthesis. *Science*, 261(5126), 1286–1292. <https://doi.org/10.1126/science.261.5126.1286>

Markovic, M., Fowler, B. O., & Tung, M. S. (2004). Preparation and Comprehensive Characterization of a Calcium Hydroxyapatite Reference Material. *Journal of research of the National Institute of Standards and Technology*, 109(6), 553–568. <https://doi.org/10.6028/jres.109.042>

Mondal, S., Pal, U., & Dey, A. (2016). Natural origin hydroxyapatite scaffold as potential bone tissue engineering substitute. *Ceramics International*, 42(16), 18338–18346. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.08.165>

Moreira, F. T. C., Guerreiro, J. R. L., Brandão, L., & Sales, M. G. F. (2015). Synthesis of molecular biomimetics. En *Biomimetic Technologies: Principles and Applications* (pp. 3–31). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100249-0.00001-x>

Moreno, B., Matamoros, Z., Rendon, J. C., Yanagisawa, K., Onda, A., Pérez, J. E., ... Rodríguez, M. (2020). Synthesis of silicon-substituted hydroxyapatite using hydrothermal process. *Boletín de la Sociedad Espanola de Ceramica y Vidrio*, 59(2), 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2019.07.001>

Newell, J. (2011). Materiales biológicos estructurales y biomateriales. En Alfaomega (Ed.), *Ciencia de Materiales, Aplicaciones en Ingeniería* (pp. 275–278). México.

Ouellette, R. J., & Rawn, J. D. (2015). Amino Acids, Peptides, and Proteins. En *Organic Chemistry Study Guide* (pp. 569–586). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801889-7.00027-3>

Ouellette, R. J., & Rawn, J. D. (2018). Amino Acids, Peptides, and Proteins. En *Organic Chemistry* (pp. 929–971). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812838-1.50029-3>

Pokhrel, S. (2018). Hydroxyapatite: Preparation, Properties and Its Biomedical Applications. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 08(04), 225–

240. <https://doi.org/10.4236/aces.2018.84016>

Prado, J., & Morán, E. (2011). Síntesis asistida por microondas de sólidos inorgánicos. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 2, 129–136. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3674454>

Przekora, A. (2019). Current trends in fabrication of biomaterials for bone and cartilage regeneration: Materials modifications and biophysical stimulations. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20020435>

Puigserver, P. (2018). Signaling Transduction and Metabolomics. En *Hematology: Basic Principles and Practice* (pp. 68–78). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35762-3.00007-X>

Rajisha, K. R., Deepa, B., Pothan, L. A., & Thomas, S. (2011). Thermomechanical and spectroscopic characterization of natural fibre composites. En *Interface Engineering of Natural Fibre Composites for Maximum Performance* (pp. 241–274). <https://doi.org/10.1533/9780857092281.2.241>

Rameshbabu, N., Rao, K. P., & Kumar, T. S. S. (2005). Accelerated microwave processing of nanocrystalline hydroxyapatite. *Journal of Materials Science*, 40(23), 6319–6323. <https://doi.org/10.1007/s10853-005-2957-9>

Rivera, E. M., Velázquez, R., Alonso, S., Alanís, J. R., Millán-Malo, B., Bucio-Galindo, L., ... Apátiga-Castro, M. (2018). HAp Nanofibers Grown with Crystalline Preferential Orientation and Its Influence in Mechanical Properties of Organic-Inorganic Composite Materials. En *Hydroxyapatite - Advances in Composite Nanomaterials, Biomedical Applications and Its Technological Facets*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71850>

Rogers, K. (2011). Molecular Components: Amino Acids. En *The components of life: from nucleic acids to carbohydrates* (pp. 41–65). Britannica Educational Pub. in association with Rosen Educational Services.

Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., Dinpanah-Khoshdargi, E., & Jamshidi, A. (2013, agosto). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, Vol. 9, pp. 7591–7621. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>

Saijo, H., Fujihara, Y., Kanno, Y., Hoshi, K., Hikita, A., Chung, U. il, & Takato, T. (2016). Clinical experience of full custom-made artificial bones for the maxillofacial region. *Regenerative Therapy*, 5, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2016.08.004>

Saranya, S., Samuel Justin, S. J., Vijay Solomon, R., & Wilson, P. (2018). L-arginine directed and ultrasonically aided growth of nanocrystalline hydroxyapatite particles with tunable morphology. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 538, 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.11.012>

Satyanarayana, U. (2017). Proteins And Aminoacids. En *Biochemistry* (5th ed., pp. 45–72). India: ELSEVIER.

Senatov, F. S., Niaza, K. V., Zadorozhnyy, M. Y., Maksimkin, A. V., Kaloshkin, S. D., & Estrin, Y. Z. (2016). Mechanical properties and shape memory effect of 3D-printed PLA-based porous scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 57, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.11.036>

Stastna, E., Castkova, K., & Rahel, J. (2020). Influence of Hydroxyapatite Nanoparticles and Surface Plasma Treatment on Bioactivity of Polycaprolactone Nanofibers. *Polymers*, 12(9), 1877. <https://doi.org/10.3390/polym12091877>

Szczęś, A., Hołysz, L., & Chibowski, E. (2017, noviembre 1). Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, Vol. 249, pp. 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.007>

Tan, X., Xue, Z., Zhu, H., Wang, X., & Xu, D. (2020). How Charged Amino Acids

Regulate Nucleation of Biomimetic Hydroxyapatite Nanoparticles on the Surface of Collagen Mimetic Peptides: Molecular Dynamics and Free Energy Investigations. *Crystal Growth and Design*, 20(7), 4561–4572. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.0c00353>

Tavafoghi, M., & Cerruti, M. (2016, octubre 1). The role of amino acids in hydroxyapatite mineralization. *Journal of the Royal Society Interface*, Vol. 13, p. 20160462. <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0462>

Uskoković, V., & Uskoković, D. P. (2011). Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 96B(1), 152–191. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31746>

Vallet, M., & Navarrete, D. A. (2016). Chapter 1: Biological apatites in bone and teeth. En *Nanoceramics in Clinical Use: From Materials to Applications* (Vol. 2, pp. 1–29). <https://doi.org/10.1039/9781782622550-00001>

Visser, J. J., & Hoekman, K. (1994). Arginine supplementation in the prevention and treatment of osteoporosis. *Medical Hypotheses*, 43(5), 339–342. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(94\)90113-9](https://doi.org/10.1016/0306-9877(94)90113-9)

Weiner, S. (2003). An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54(1), 1–29. <https://doi.org/10.2113/0540001>

Yao, Q., Wei, B., Guo, Y., Jin, C., Du, X., Yan, C., ... Wang, L. (2015). Design, construction and mechanical testing of digital 3D anatomical data-based PCL–HA bone tissue engineering scaffold. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5360-8>

Yontar, O., & Gürbüz, M. (2019). Mechanical Properties of Dense Artificial Bone Fabricated by Powder Processing. *International Journal of Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies*, 3(1), 22–24. Recuperado de <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/663658>

Zhang, H., & Zhu, Q. (2009). Synthesis of nanospherical and ultralong fibrous hydroxyapatite and reinforcement of biodegradable chitosan/hydroxyapatite composite. *Modern Physics Letters B*, 23(31–32), 3967–3976. <https://doi.org/10.1142/s0217984909022071>

Zhang, J., Feng, Y., Zhou, X., Shi, Y., & Wang, L. (2019). Research status of artificial bone materials. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. <https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1685518>

Dirección General de Bibliotecas UAQ

9. ANEXO

9.1 Método Hidrotermal asistido por microondas

La utilización de radiación por microonda en síntesis hidrotermales presenta grandes ventajas a diferencia del calentamiento convencional, tales como: generar un calentamiento homogéneo en toda la mezcla de reacción y durante toda la reacción, a través de una transferencia de energía muy eficiente, rápida nucleación y crecimiento de la sustancia que se está sintetizando, y una distribución estrecha de su tamaño de cristalito (Alanís et al., 2016). Además de ahorro energético, procesamiento económico y respetuoso con el medio ambiente (Prado & Morán, 2011).

En el tratamiento térmico convencional, la energía es transferida a la mezcla de reacción por conducción y convección, creando gradientes térmicos. Mientras que en el calentamiento por microondas, la energía se transfiere directamente a la solución mediante una interacción a nivel molecular entre el campo eléctrico de las ondas electromagnéticas y el momento dipolo de las moléculas en la mezcla de reacción (Figura 9.1).

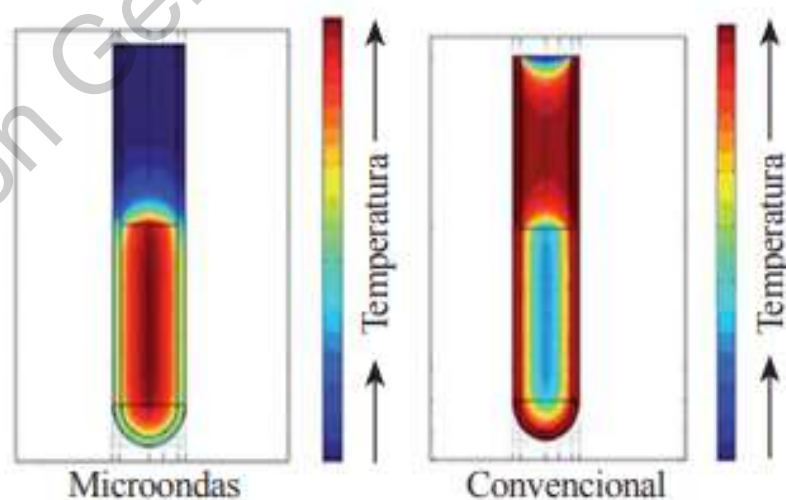


Figura 9.1 Comparación de la distribución de la temperatura durante un calentamiento microondas y uno convencional. (Prado & Morán, 2011)

9.2 Fundamento de difracción de Rayos X

Es una técnica analítica no destructiva, se utiliza comúnmente para la identificación de fases cristalinas presentes en las muestras, así como para determinar posibles orientaciones cristalinas preferenciales, medir el tamaño de cristalito y determinar la calidad cristalina de las muestras.

En esta técnica se hace incidir a la muestra un haz de Rayos X producidos por átomos de cobre, con una longitud de onda de 1.54 Å, para que sea difractado por los planos cristalinos de la muestra, conforme a la ley de Bragg (ecuación 8.1).

$$2d\sin\theta = n\lambda \quad (9.1)$$

Donde d es la distancia interplanar, λ es la longitud de onda de las ondas incidentes y θ es el ángulo de incidencia del haz.

9.3 Funcionamiento de microscopio electrónico de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM), utiliza la interacción de los electrones con la superficie de la muestra para formar una imagen de ella que, a diferencia con los microscopios ópticos, podemos conseguir una resolución de hasta 100 Å. El funcionamiento de la microscopía electrónica de barrido consiste en hacer incidir un barrido de haz muy fino de electrones de alta energía sobre la muestra. La muestra se recubre con una capa muy fina de oro o carbón, que le otorga propiedades conductoras. Al incidir el haz la superficie de la muestra, esta puede emitir electrones secundarios, Auger y retrodispersados; con los que se puede obtener imágenes de la morfología y la superficie de la muestra.

El SEM construye un mapa o patrón indirectamente, que se puede interpretar como la imagen de la morfología de la muestra. Los electrones secundarios o retrodispersados que son emitidos por la superficie de la muestra se miden a través de un detector. La corriente de electrones se amplifica al pasar a un fotoamplificador y un tubo de rayos catódicos que nos muestra una variación de intensidad en forma de mapa.

9.4 Fundamento de fluorescencia de Rayos X

El análisis por fluorescencia de rayos X es una metodología analítica que permite determinar la composición química de las muestras. Consiste en la emisión de rayos X secundarios característicos emitidos por los átomos que constituyen a la muestra, esta emisión es el producto del bombardeo rayos X de alta energía.

Los rayos X incidentes se producen por una fuente de radiación, que puede ser un tubo de rayos X o alternativamente un sincrotrón o material radiactivo. Estos remueven un electrón de una capa interior del elemento irradiado creando un hueco inestable, posteriormente un electrón de la capa exterior decae para ocupar el hueco que se había formado, y la energía excedente, se disipa emitiendo un fotón de rayo X característico del átomo emisor.

Cada transición produce un fotón fluorescente que tiene una energía característica igual a la diferencia de energía de los orbitales inicial y final. La longitud de onda de la radiación fluorescente puede ser calculada a partir del postulado de Plack (ecuación 8.2).

$$\lambda = h \cdot \frac{c}{E} \quad (8.2)$$

La intensidad de las radiaciones características está relacionada directamente con la cantidad de cada elemento químico presentes en la muestra. Por lo que es un poderosa técnica utilizada en química analítica(Brower, 2010).

9.5 Fundamento del análisis termogravimetrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica analítica que se utiliza para determinar la estabilidad térmica de un material y su fracción de componentes volátiles al monitorear el cambio de peso que ocurre cuando la muestra se calienta a velocidad constante y bajo una atmósfera controlada (aire, O₂, N₂, H₂ o Ar). El peso se registra en función del aumento de temperatura, esto permite determinar la composición de los materiales. Por lo tanto, esta técnica es capaz de caracterizar materiales que presenten pérdida o ganancia de peso debido a la descomposición,

deshidratación u oxidación a una temperatura característica (Rajisha, Deepa, Pothan, & Thomas, 2011).

La termobalanza es un instrumento que permite medir continuamente el peso de la muestra en función de la temperatura o el tiempo. Se compone de una balanza analítica sensible, un horno que permite calentar la muestra a una velocidad controlada y un procesador (ordenador) para el control del instrumento y visualización de datos.

Dirección General de Bibliotecas UAQ