UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROXIAPATITA DOPADA CON NANOPARTÍCULAS DE ZnO CON POTENCIALES APLICACIONES BIOMÉDICAS

Obtaining and Characterization of Hydroxyapatite doped with ZnO nanoparticles with potential biomedical applications

**DIANA CAROLINA GÁLVEZ COY**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Física y Química

Manizales, Colombia

2016

# OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROXIAPATITA DOPADA CON NANOPARTÍCULAS DE ZnO CON POTENCIALES APLICACIONES BIOMÉDICAS

**DIANA CAROLINA GÁLVEZ COY**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Física**

Director:

**Dr. CARLOS VARGAS HERNANDEZ**

Grupo de Investigación:

**LABORATORIO DE PROPIEDADES ÓPTICAS DE LOS MATERIALES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Física y Química

Manizales, Colombia

2016

# Agradecimientos

Al profesor Carlos Vargas Hernández de la Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, por su apoyo durante el desarrollo de esta investigación, además por permitirme trabajar en el laboratorio de Propiedades Ópticas de los Materiales (POM).

A los estudiantes que contribuyeron en la realización de este trabajo, especialmente a Natalia Álzate y María Fernanda Vargas, por el acompañamiento incondicional durante todo el proceso de la investigación, además deseo agradecer a Marco Avellaneda por su colaboración en la síntesis de ZnO.

A mi compañero Cristian Alonso Rodríguez, por el trabajo realizado sobre Evaluación de la Actividad Antimicrobiana.

A mis amigos Néstor Eduardo Sánchez, Catalina Serna Plata, Diego Alonso Guzmán y Gabriel Alberto Soler, por el apoyo y acompañamiento durante el desarrollo de la investigación.

Agradezco a COLCIENCIAS y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, por otorgarme en dos ocasiones la beca de “Jóvenes Investigadores e innovadores".

# Resumen

En este trabajo se presenta la obtención y caracterización de hidroxiapatita natural a partir de muestras de la región cortical de hueso tipo fémur bovino, las cuales fueron calcinadas a 600°C, 800°C y 1000°C. A partir de la caracterización realizada mediante espectroscopia Raman se puede observar que después del proceso de calcinación desaparecen las bandas ubicadas en 1443, 1677 y 2935 $cm^{-1}$, las cuales están asociadas al colágeno presente en el hueso, y se genera una intensa banda ubicada en 963 $cm^{-1}$ la cual está asociada a la hidroxiapatita. Los patrones de difracción de rayos X evidencian los planos característicos de la hidroxiapatita (211), (112) y (310), asimismo, al aumentar la temperatura de calcinación el grado de cristalinidad de las muestras aumenta, adicionalmente el análisis EDS indica la presencia de elementos como fosforo, calcio, oxigeno, carbón y magnesio.

Además se incorporó ZnO a la matriz de HA obtenida a 1000 °C y se estudió la actividad antimicrobiana de las muestras sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC2 5923, mediante el método de difusión en disco.

Palabras claves: Hidroxiapatita, ZnO, Actividad Antimicrobiana, Raman, DRX.

# Abstract

In this paper it was evaluated the obtention and characterization of pure hydroxyapatite, it from cortical region of the bone calcined at temperatures of 600°C, 800°C and 1000°C. From the characterization realized by Raman spectroscopy it was observed that the bands in 1443, 1677 and 2935 cm-1 disappear, these bands are associated with collagen present in the bone, and finally, an intense band that is placed in 950 cm-1 is associated with hydroxyapatite. Diffraction X-rays patterns show the characteristic planes of hydroxyapatite (211), (112) and (310), furthermore, if the calcination temperature increase, the degree of crystallinity of the samples increases, additionally EDX analysis indicates the presence of elements such as phosphorus, calcium, oxygen, carbon and magnesium.

Furthermore, ZnO was incorporated into the HA matrix obtained at 1000°C and the antimicrobial activities of the samples were investigated against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Staphylococcus aureus* ATCC2 5923 strains using the disc diffusion method.


Keywords: Hydroxyapatite, ZnO, Antimicrobial activities, Raman, XRD.

# Contenido

**Pág.**

**Resumen** ..... **IX**

**Lista de figuras** ..... **XIII**

**Lista de imágenes** ..... **XIV**

**Lista de tablas** ..... **XV**

**OBJETIVOS DE LA TESIS** ..... **16**

Objetivo General ..... 16
Objetivos Específicos ..... 16

**INTRODUCCIÓN** ..... **2**

**Capítulo 1: Marco Teórico** ..... **4**

1.1. Hueso ..... 4
1.1.1 Composición ..... 6
1.1.2 Propiedades Mecánicas ..... 7
1.1.3 Funciones del Hueso ..... 8
1.2. BIOMATERIALES ..... 9
1.2.1. Clasificación de los Biomateriales Cerámicos ..... 9
1.3. Hidroxiapatita ..... 11
1.3.1. Composición ..... 11
1.3.2. Propiedades Estructurales ..... 12
1.3.3. Métodos de Obtención ..... 14

**Capítulo 2: Técnicas de Caracterización** ..... **25**

2.1. Difracción de Rayos X (DRX) ..... 25
2.2. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) ..... 27
2.3. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) ..... 28
2.4. Espectroscopia Raman ..... 29

**Capítulo 5: Conclusiones** ..... **31**

**Ponencias en Eventos** ..... **33**

**Referencias** ..... **34**

# Lista de figuras

**Pág.**

**Figura 1-1** Estructura cristalina HA ..... 12
**Figura 1-2** Estructura de la HA vista esquemática ..... 13
**Figura 1-3** Proceso Precipitación obtención HA..... 15
**Figura 1-4** Proceso Sol-Gel obtención HA..... 16
**Figura 1-5** Reacción en estado sólido obtención HA ..... 17
**Figura 1-6** Método Químico – Mecánico obtención HA..... 18
**Figura 1-7** Proceso obtención HA a partir de cascara de huevo ..... 20
**Figura 1-8** Proceso obtención HA a partir de esqueleto de coral ..... 21
**Figura 1-9** Extracción de HA a partir de Fuentes Naturales ..... 24
**Figura 2-1**Esquema de la interacción de los rayos X y la estructura cristalina del material 25
**Figura 2-2**a)Imagen con electrones secundarios b)Imagen con electrones retrodispersados ..... 28

# Lista de imágenes

**Pág.**

**Imagen 1-1** Hueso tipo fémur bovino ..... 5

**Imagen 1-2** Hueso de humano tipo fémur ..... 5

# Lista de tablas

**Pág.**

**Tabla 1-1** Composición Química del Hueso ..... 6
**Tabla 1-2** Propiedades Mecánicas Tejido Óseo ..... 8
**Tabla 1-3** HA de origen animal Comercializada ..... 19

# OBJETIVOS DE LA TESIS

## OBJETIVO GENERAL

- Obtener y caracterizar hidroxiapatita natural con nanopartículas de ZnO con potenciales aplicaciones biomédicas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener hidroxiapatita mediante tratamiento térmico.
- Realizar la caracterización estructural de la región cortical y trabecular en muestras de hueso tipo fémur vacuno y de la hidroxiapatita natural mediante Difracción de Rayos X.
- Determinar la concentración relativa de minerales y óxidos en la región cortical y trabecular de las muestras y de la hidroxiapatita natural mediante Espectroscopia de Absorción Atómica y Espectroscopia Raman.
- Obtener hidroxiapatita natural con nanopartículas de ZnO
- Analizar estructural y químicamente la hidroxiapatita con nanopartículas de ZnO, mediante Difracción de Rayos X, Microscopia Electrónica de Barrido y Espectroscopia Raman.

# INTRODUCCIÓN

La Hidroxiapatita es un biomaterial ampliamente estudiado y empleado en la regeneración ósea, debido a sus propiedades de biocompatibilidad y osteoconductividad. Una de las desventajas de éste biomaterial es que no inhibe la formación de bacterias, presentando una baja actividad antimicrobiana.

Actualmente una de las mayores complicaciones en implantes óseos son las infecciones causadas por microorganismos, ya que puede traer consecuencias económicas para el paciente y para las instituciones de salud, ya que se debe intervenir el paciente con terapia antibiótica, que en muchos casos no es efectiva y puede implicar como última instancia el retiro del implante (Garza et al., 2013).

Debido a lo anterior varias investigaciones se han enfocado en la incorporación de elementos a la estructura de la Hidroxiapatita para mejorar sus propiedades antimicrobianas, mecánicas y propiedades de bioactividad.

El Óxido de Zinc (ZnO) es un material promisorio en diversas aplicaciones ya que tiene propiedades semiconductores, presenta actividad antibacteriana y es un promotor de crecimiento (Chao Wang et al., 2012; Jones et al., 2008), además es considerado como un material seguro para los humanos y animales (Y. Liu et al., 2009; Reddy et al., 2007).

Por esta razón en este trabajo se presenta la obtención y caracterizar hidroxiapatita natural con nanopartículas de ZnO.

En este documento se muestran conceptos generales sobre el tejido óseo y biomateriales, haciendo énfasis en la Hidroxiapatita y los métodos más utilizados para su síntesis.

Asimismo se presenta una corta revisión sobre las técnicas de caracterización empleadas como Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopia Raman, Espectroscopia de Dispersión de Energía (EDS), Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) y Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

Además se describen los procedimientos empleados para la obtención de Hidroxiapatita, la incorporación de ZnO a la estructura de la Hidroxiapatita obtenida a 1000°C y la Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Hidroxiapatita dopada con ZnO frente a microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa.*

Finalmente los productos obtenidos son analizamos usando las diferentes técnicas de caracterización, evaluando sus propiedades estructurales, vibraciones y morfológicas.

# Capítulo 1: Marco Teórico

## 1.1. HUESO

Es un tejido conectivo, principal constituyente del esqueleto, sirve de soporte a las partes blandas y protege órganos vitales. Además, aloja la médula ósea, encargada de producir células sanguíneas mediante el proceso de la hematopoyesis, y proporciona apoyo a los músculos esqueléticos. Es altamente vascular, con excelente capacidad de auto reparación, pudiendo alterar sus propiedades y configuración cuando se expone a una lesión. Fisiológicamente, actúa como depósito de calcio, fosfato y otros iones, que son importantes para la contracción muscular y para la actividad nerviosa, entre otras funciones, almacenándolos o liberándolos de manera controlada para mantener constante su concentración en los líquidos orgánicos.

Todos los huesos están compuestos de dos tipos de tejido óseo: el esponjoso o trabecular y el compacto o cortical (ver imagen 1-1, imagen 1-2). Químicamente son iguales pero se diferencian en su densidad volumétrica, pues la masa de tejido óseo esponjoso ocupa un mayor volumen que la misma masa del tejido óseo compacto.

El tejido cortical se encuentra en la corteza del hueso. Esta constituido aproximadamente por un 22% de materia orgánica y un 78% de materia inorgánica , además posee una estructura densa y presenta un rango de porosidad entre el 5 y el 10% (Buckwalter et al., 1996).

El tejido trabecular se encuentra en los extremos de los huesos largos, en la parte denominada epifisis. Se compone de placas delgadas, o trabéculas, en una estructura de malla amplia; los intersticios entre las trabéculas son llenados con médula roja y su porosidad varía entre el 50 y el 90% (Buckwalter et al., 1996).

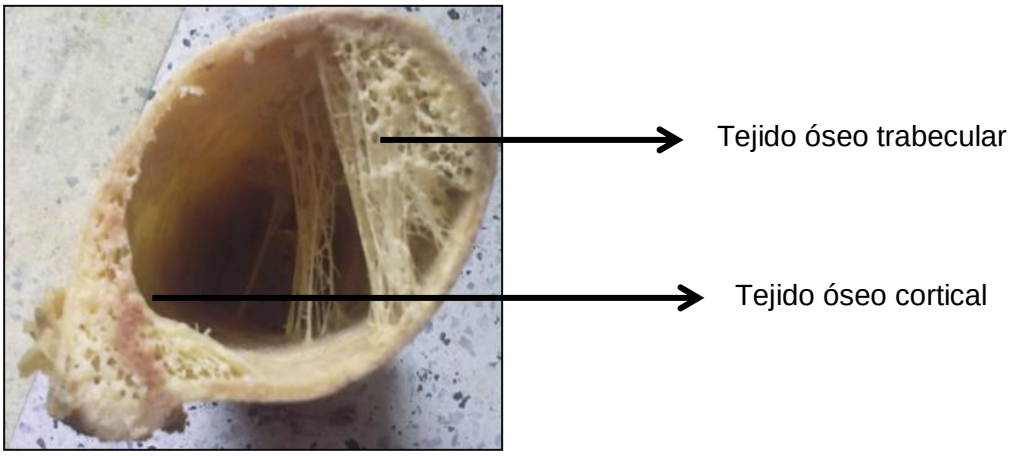


**Imagen 1-1.** Hueso tipo fémur bovino

En los huesos largos, las extremidades o epífisis están formadas por hueso trabecular con una delgada capa superficial compacta y la diáfisis (parte cilíndrica) está casi totalmente formada por tejido óseo compacto, con pequeñas cantidades de hueso esponjoso en su parte más interna, que delimita el conducto medular; entre éste tipo de huesos se encuentran el fémur, la tibia, el húmero, los metacarpianos, los metatarsianos y las falanges.

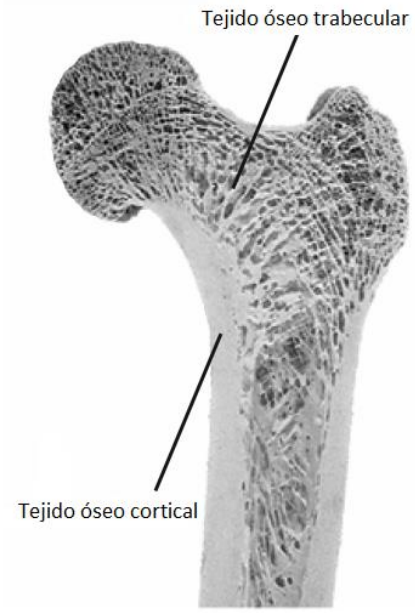


**Imagen 1-2**. Hueso de humano tipo fémur

### 1.1.1 Composición

El conocimiento de la composición de huesos ha permitido explorar las relaciones existentes entre las características químicas y estructurales óseas con las propiedades mecánicas, térmicas, eléctricas y enfermedades presentes en la estructura ósea. Diferentes investigaciones han reportado que la composición de los huesos está sometida a cambios de acuerdo al lugar, enfermedades, edad e ingesta de alimentos.

El hueso tiene componentes inorgánicos, que representan el 65% de su peso seco aproximadamente, y el 35% de componentes orgánicos. La fase orgánica está constituida principalmente por Colágeno Tipo I, y la inorgánica por hidroxiapatita, además el hueso presenta en menor cantidad lípidos, proteínas y trazas de elementos como Magnesio, Sodio y Potasio, entre otros.

La componente orgánica le da forma al hueso y contribuye a la capacidad de resistir a la tracción, mientras que la componente inorgánica o mineral contribuye a la resistencia a la compresión. Los huesos desmineralizados son flexibles y resistentes a la tracción, durante el proceso de maduración ósea se genera un incremento de la mineralización en el proceso de maduración ósea, haciendo al hueso más rígido, quebradizo y menos elástico. En la tabla 1-1, se presenta el % de los elementos que componen el hueso.

**Tabla 1-1.** Composición Química del Hueso (Orlovskii et al., 2002)

| Elemento | % |
|---|---|
| Calcio | 34,8 |
| Fosforo | 15,2 |
| Sodio | 0,9 |
| Magnesio | 0,72 |
| Potasio | 0,03 |
| Carbonatos | 7,4 |
| Flúor | 0,03 |
| Cloro | 0,13 |
| Otros Elementos | 0,04 |

### 1.1.2 Propiedades Mecánicas

Se ha registrado que tanto la arquitectura como la composición del hueso influyen en las características mecánicas de este material, tales como la alta elasticidad debido al colágeno, y la dureza debida a los cristales de hidroxiapatita.

El estudio de las propiedades mecánicas del hueso permite predecir las fuerzas que el hueso es capaz de resistir, las posibles consecuencias de las enfermedades, entender el efecto de envejecimiento y otras características. Se han estudiado las propiedades mecánicas de los tejidos óseos corticales y trabeculares ampliamente, la mayoría de los estudios concuerdan al afirmar que ambos tipos de tejido contienen la misma composición de la matriz y estructura, pero el hueso cortical tiene una porosidad mucho menor que el hueso trabecular (Buckwalter et al., 1996a). La porosidad se define como el volumen de vacío por unidad de volumen de hueso, y representa la parte proporcional del hueso ocupado por médula ósea o material no-mineralizado que se encarga de la irrigación del hueso. La geometría y orientación de las trabéculas contribuyen en el comportamiento anisotrópico estructural que es evidente tanto en el hueso trabecular, como en el hueso compacto. Los poros del hueso trabecular interconectados de forma irregular proporcionan una densidad aparente y unas propiedades mecánicas del hueso inconstantes. El módulo de elasticidad y la resistencia a la fractura del hueso cortical pueden ser diez veces mayores que aquel de un volumen similar de hueso trabecular. El hueso esponjoso tiene aproximadamente veinte veces más superficie por unidad de volumen que el cortical, por lo cual se cree que debido a esta diferencia, el hueso esponjoso presenta habitualmente una mayor actividad metabólica y una mayor velocidad de remodelación, respondiendo más rápidamente a las cargas mecánicas que el hueso cortical. La característica porosa del hueso esponjoso tiene una función importante en la absorción de fuerzas en las articulaciones, el reemplazo de la epífisis y del cartílago que la recubre por una prótesis, unida al hueso por medio de un cemento de polimetilmetacrilato, elimina la propiedad de absorción de impactos lo cual aumenta drásticamente las fuerzas transmitidas por la articulación.

Se reporta una relación entre la densidad aparente del hueso y las propiedades mecánicas; las propiedades del hueso trabecular son similares al hueso compacto cuando se observan en forma microscópica (Cowin et al., 2003). La resistencia máxima a tensión se ha considerado como la propiedad mecánica más importante de esta

estructura, por consiguiente, la mayoría de las pruebas hechas para estudiar las propiedades mecánicas de los huesos han sido a tensión con probetas orientadas a lo largo del eje axial de los huesos.

**Tabla 1-2.** Propiedades Mecánicas Tejido Óseo (Hench et al., 1993)

| | Tejido Óseo Cortical | Tejido Óseo Trabecular |
|---|---|---|
| Fuerza de Compresión (MPa) | 100-230 | 2-12 |
| Resistencia a la Tracción (MPa) | 50-150 | 10-20 |
| Módulo de Young (GPa) | 7-30 | 0,05-0,5 |

### 1.1.3 Funciones del Hueso

Desde el punto de vista fisiológico, las funciones básicas de los huesos y esqueleto son:

- Proveer un cuadro rígido de soporte para los músculos y tejidos blandos.
- Formar varias cavidades que protegen los órganos internos de posibles traumatismos. Por ejemplo, el cráneo protege el cerebro frente a los golpes, y la caja torácica, formada por costillas y esternón protege los pulmones y el corazón.
- Almacenar minerales, especialmente calcio y fósforo, necesarios para la contracción muscular y otras funciones. Cuando son necesarios, el hueso libera dichos minerales en la sangre.
- Producir células sanguíneas: dentro de cavidades situadas en ciertos huesos, un tejido conectivo denominado médula ósea roja produce las células sanguíneas rojas o hematíes mediante el proceso denominado hematopoyesis.
- Almacenar grasas de reserva: la médula amarilla consiste principalmente en adipocitos con unos pocos hematíes dispersos. Es una importante reserva de energía química.

# 1.2. BIOMATERIALES

Los Biomateriales son los materiales o sustancias empleadas para ser implantadas dentro de un sistema vivo, son utilizados para el soporte o sustitución de tejidos que hayan sufrido traumas, degeneración o enfermedades.

Los requisitos necesarios para definir el éxito en una aplicación de un biomaterial se deben a la respuesta biológica, resistencia adecuada y al comportamiento mecánico. Generalmente el fracaso de estas implantaciones se debe a la infección, ya que estos materiales ejercen una atracción sobre lo microorganismos, además pueden generar rechazos inmunológicos y transmisión de enfermedades virales.

Se dividen en:

- Biomateriales Metálico son generalmente usados en la osteosíntesis y las artroplastias (De función temporal), son materiales de alta resistencia transversal y de tensión, utilizados para ortopedia e implantes dentales
- Biomateriales Cerámicos son materiales que se caracterizan por poseer una buena biocompatibilidad, su aplicación es de uso ortopédico, revestimiento de metales, válvulas cardiacas u odontología, así mismo, presentan similitud con las propiedades físicas del hueso, además de ser resistentes a la corrosión.
- Biomateriales Poliméricos son usados en aplicaciones ortopédicas, además se pueden construir músculos y tendones artificiales, son implantes elásticos y resistentes al desgaste, a su vez, los biomateriales poliméricos se subdividen en reticulares, laminares y compuestas.

## 1.2.1. Clasificación de los Biomateriales Cerámicos

Las cerámicas son los materiales más parecidos al componente mineral del hueso, son resistentes a la corrosión y de bajo coeficiente de fricción, siendo usadas en aplicaciones ortopédicas e implantaciones dentales, ejemplo de ellas son la Alúmina, Zirconia, Fosfato Tricalcico**,** Hidroxiapatita, Carbón pirolítico, Silicatos de Calcio y Vidrios bioactivos.

De acuerdo a la respuesta de los tejidos y la actividad química en el organismo los biomateriales cerámicos se pueden dividir en:

- Bionertes, con una interacción mínima con el tejido circundante, este material debe de ser insoluble y no afectar a las células
- Bioactivos, tienen la capacidad de desarrollar una fuerte unión con el tejido óseo, interactuando con los tejidos blandos y el hueso, ayudando a la formación de hidroxiapatita carbonatada en la superficie.
- Biorreabsorbibles**,** además de ser bioactivos, son reabsorbidos en el organismo mientras el defecto se corrige

Entre los Biomateriales cerámicos más estudiados se encuentra los de fosfatos de calcio, los cuales son de amplio interés para ser utilizados como rellenos o sustitos óseos, debido a que poseen casi la misma composición química que el esqueleto de los vertebrados, son biocompatibles y bioactivos logrando la unión química con el hueso e incorporándose al tejido óseo, dependiendo de su aplicación, se utilizan diferentes fases de compuestos de Fosfato de Calcio como la hidroxiapatita.

## 1.3. HIDROXIAPATITA

La Hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ es un material que pertenece a las cerámicas de fosfato de calcio, ha sido ampliamente utilizada en aplicaciones biomédicas como tratamientos quirúrgicos, ortopédicos y odontológicos (Anita Lett et al., 2016; Ansari et al., 2011; Rau et al., 2014) para reparar, aumentar o sustituir el tejido óseo dañado, ya que es un material biocompatible, bioactivo y posee propiedades osteoactivas, es decir, estimula a la formación del hueso. Se puede obtener a partir de síntesis química mediante métodos como: precipitación, hidrolisis y sol-gel (Abidi et al., 2014a; Agrawal et al., 2011; Wang et al., 2015), o extraerla a partir de fuentes naturales como cascara de huevos, corales y huesos de origen animal (Fadli et al., 2014; Kamalanathan et al., 2014; Niakan et al., 2015; Venkatesan et al., 2010) . Dependiendo del método de síntesis se puede obtener Hidroxiapatita con diferentes morfologías, estequiometria y grado de cristalinidad.

### 1.3.1. Composición

La hidroxiapatita (HA) está compuesta principalmente por calcio y fosforo, aunque dependiendo del método de obtención puede presentar trazas de elementos como sodio y magnesio. Una de las principales características de éste biomaterial es la relación molar calcio-fosforo ya que entre menor sea la relación, mayor es la acidez y solubilidad de las muestras (Sahin, 2006), además de ser un factor relacionado con las propiedades mecánicas del material. La HA en fase pura tiene una relación molar Ca/P de 1,67, la cual presenta mayor rigidez comparada con HA que tiene relación molar diferente cuando la relación es de 1,5 se obtienen muestras con deficiencia de calcio (Ramesh, 2010) y si la relación molar es mayor a 1,67 la HA contiene grupos carbonatos ademas de presentar trazas de Mg (Figueiredo et al., 2010). HA con relaciones que varían desde 1,5 a 2,0 han sido utilizadas como recubrimientos cerámicos.

## 1.3.2. Propiedades Estructurales

La HA en fase pura posee una estructura hexagonal con un grupo espacial P63/m, además con parámetros de red $a = b = 9{,}45$ Å y $c = 6{,}88$ Å, dependiendo del método de obtención y la relación $Ca/P$, éstos parámetros pueden variar. La celda unidad está formada por calcio, fosfatos e hidroxilos como se puede observar en las figuras 1-1 y 1-2.

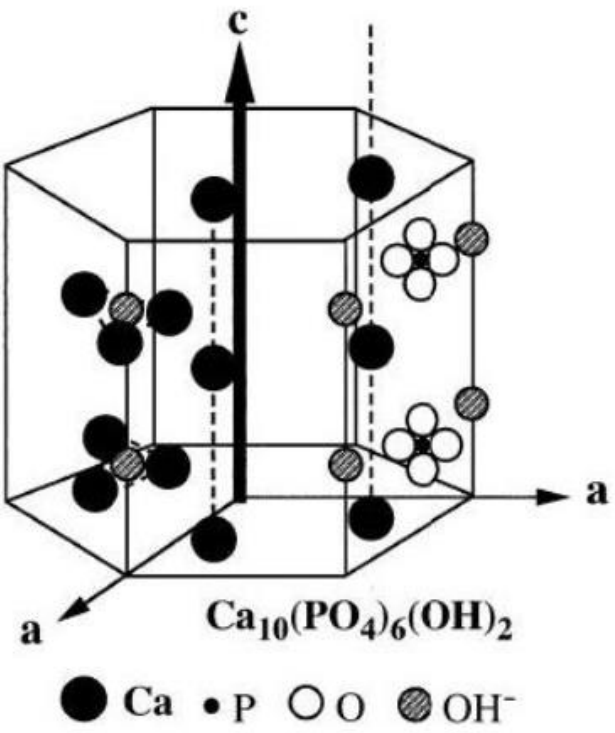


**Figura 1-1.** Estructura cristalina HA (Nakano et al., 2002)

La HA presenta dos tipos de cationes de calcio, nombrados como Ca (I) y Ca (II), los Ca (I) están situados en los bordes de la celda unitaria hexagonal formando un anillo y en el centro está ubicado el ion hidroxilo, los Ca (II) se encuentran formando triángulos equiláteros con la columna de los iones hidroxilo (ver figura 1-2)

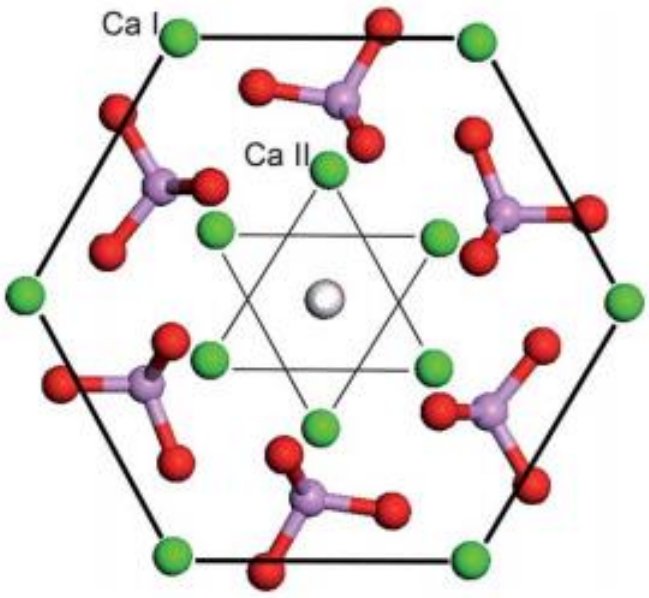


**Figura 1-2.** Estructura de la HA vista esquemática (Lu et al., 2011)

La introducción de pequeñas cantidades de algunos iones puede causar modificaciones estructurales como cambio en los parámetros de red y cristalinidad de la HA.

La ubicación de los iones de hidroxilo pueden ser ocupados por iones cloruro y fluoruro (Cho, Yoo, Chung, & Rhee, 2014), debido a la similitud de carga y tamaño, asimismo, la ubicación de los cationes de calcio pueden ser reemplazados por iones de Magnesio ($Mg^{2+}$), Manganeso ($Mn^{2+}$) y Zinc ($Zn^{2+}$).

## 1.3.3. Métodos de Obtención

Diversos son los procesos y fuentes de obtención de HA, mediante síntesis química se encuentran métodos como hidrotermal, precipitación y sol-gel, asimismo, fuentes naturales como cascaras de huevo, corales, escamas y huesos de pescado además de huesos porcinos y bovinos, son ampliamente utilizados.

### 1.3.3.1. Hidroxiapatita obtenida por Síntesis Química

Químicamente se puede sintetizar HA mediante la reacción de una fuente de calcio con una fuente de fosfato, donde se busca obtener HA estequiométrica con una relación molar $Ca/P = 1{,}67$. La producción de HA sintética se puede dividir en dos grandes categorías: Síntesis de química húmeda y Síntesis de química seca

#### 1.3.3.1.1. Síntesis de Química Húmeda

Es usada principalmente para la síntesis de HA nanoestructurada con una morfología definida. Una de las principales ventajas de la síntesis húmeda es que el único subproducto formado es agua y es muy baja la probabilidad de contaminación durante el proceso. Entre los métodos se encuentra el hidrotérmico, precipitación y sol-gel.

##### *1.3.3.1.1.1. Hidrotérmico*

Es uno de los métodos más comunes para la síntesis de HA, donde se puede obtener HA estequiométrica

Efectos de parámetros como temperatura y tiempo, sobre la morfología y tamaño de partícula han sido estudiados. Cuando la temperatura en el proceso hidrotérmico es elevada la cristalinidad y el tamaño de cristalito aumenta (Jin et al., 2015), además, el tiempo del proceso no tiene ningún efecto sobre la morfología y el tamaño de partícula (Earl et al., 2006).

Es un método costoso debido a que se necesitan equipos especializados para elevar la temperatura y presión durante el proceso, además es difícil controlar el tamaño y morfología de las partículas (Guang et al., 2015).

#### *1.3.3.1.1.2. Precipitación*

Es uno de los métodos más relevantes ya que se puede producir una cantidad considerable de HA, es un método sencillo y económico, aunque parámetros en el proceso como pH, tiempo de agitación y temperatura de reacción influyen directamente en la calidad de la HA obtenida donde puede variar el tamaño de partícula, morfología y cristalinidad (García et al., 2006). Usualmente se utilizan como precursores hidróxido de calcio $(Ca(OH)_2)$ y ácido fosfórico $(H_3PO_4)$, y para el ajuste del pH de la reacción se utiliza amonio (Abidi et al., 2014b; Saeril et al., 2003), el control del pH es fundamental para la síntesis de HA estequiométrica ya que un pH por debajo de 9 puede dar origen a HA con deficiencia de calcio (Agrawal et al., 2011).

Reacción de $Ca(OH)_2$ y $H_3PO_4$ para la obtención de HA (Sequeda et al., 2012)

$$10Ca(OH)_2 + 6H_3PO_4 \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 18H_2O \qquad (1)$$

El tamaño, la forma y el área superficial de la HA obtenida a partir de la reacción anterior están fuertemente relacionadas con la velocidad de adición del ácido y la temperatura de reacción (Ferraz et al., 2004).

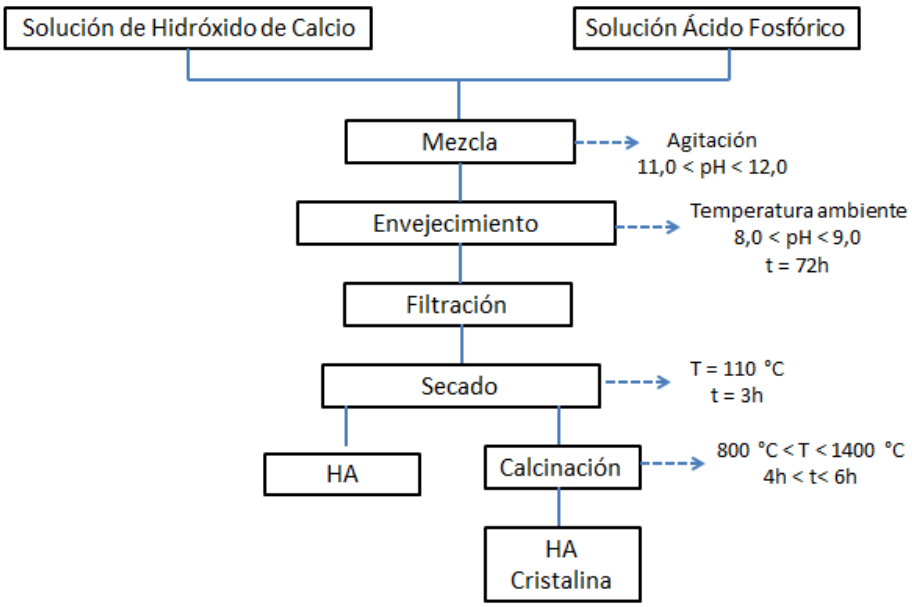


**Figura 1-3.** Proceso Precipitación obtención HA (Guzmán et al., 2005)

*1.3.3.1.1.3. Sol-Gel*

Método ampliamente utilizado ya que se puede producir nano y micro partículas de HA, asimismo, permite la preparación de revestimientos de HA sobre sustratos metálicos (Liu et al., 2002), además, se puede controlar el tamaño de poro (Owens et al., 2016), parámetro relacionado con la bioactividad del biomaterial. Sin embargo los materiales utilizados en este método son costosos, se obtiene HA con una baja homogeneidad (Sopyan et al., 2008) y es un proceso que requiere de un estricto control ya que se ve afectado por factores como la velocidad de gelatinación y tiempo de envejecimiento el cual está directamente relacionado con la formación de cristales y aglomeración de partículas (Chai et al., 1998), donde se reportan tiempos de mínimo 24 horas para la formación de HA (Beganskien et al., 2006)

Diversos son los materiales utilizados como precursores de calcio y fosforo entre los más usados se encuentra el Nitrato de Calcio y el Óxido de Fosforo, la HA obtenida generalmente esta acompaña de una fase de $CaO$, el cual se elimina a partir de tratamientos térmicos ya que la existencia de esta fase disminuye las propiedades biocompatibles del material (Hsieh et al., 2001)

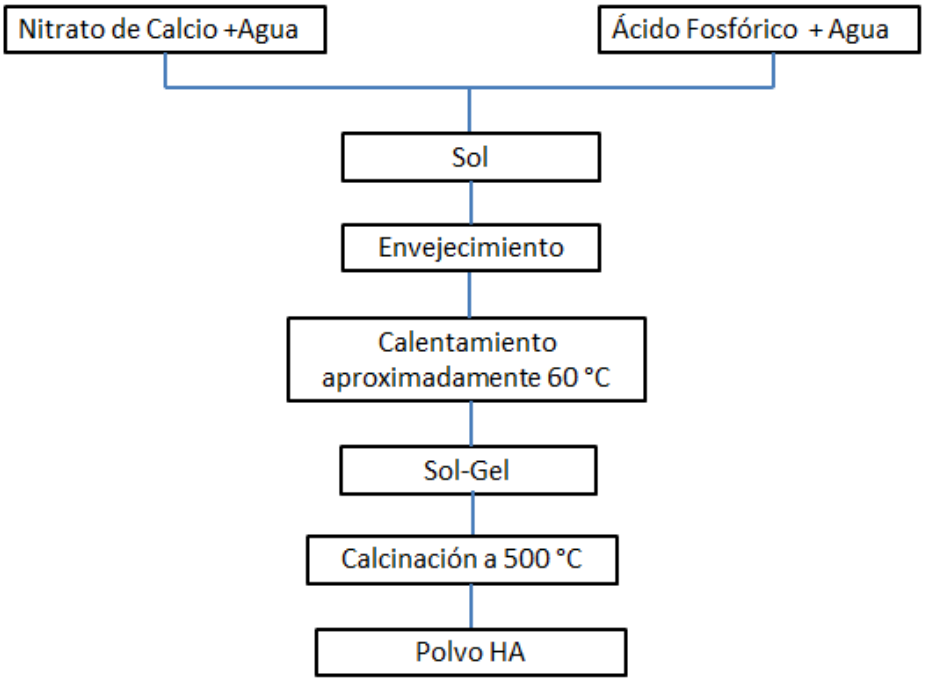


**Figura 1-4.** Proceso Sol-Gel obtención HA (Rodrigues et al., 2012)

#### 1.3.3.1.2. Síntesis de Química Seca

Generalmente se utiliza para la producción en masa de HA, donde se obtienen partículas de tamaño grande y sin una forma definida, la principal ventaja es que no se requiere un control riguroso de los parámetros durante el proceso de obtención. En esta categoría se pueden encontrar técnicas como: reacción en estado sólido y métodos químicos-mecánicos.

##### *1.3.3.1.2.1. Reacción en Estado Solido*

Es un método sencillo para la síntesis de HA, consiste en mezclar los precursores de calcio y fosforo mediante el uso de un mortero, seguido la mezcla se lleva a tratamiento térmico a altas temperaturas, obteniendo HA con un grado alto de cristalinidad.

Entre los materiales utilizados como precursores se encuentran: Nitrato de Calcio ($Ca(NO_3)_2$, Fosfato Diamónico ($(NH_4)_2HPO_4$), Carbonato de Calcio ($CaCO_3$) y Fosfato Dicálcico ($CaHPO_4$) (Arkin et al., 2015; Guo et al., 2013).

Mediante éste método se obtiene HA estequiométrica, estable y cristalina (Arkin et al., 2015), donde la temperatura de calcinación es un parámetro importante ya que dependiendo de ésta el tamaño y morfología de las partículas pueden variar (Guo et al., 2013).

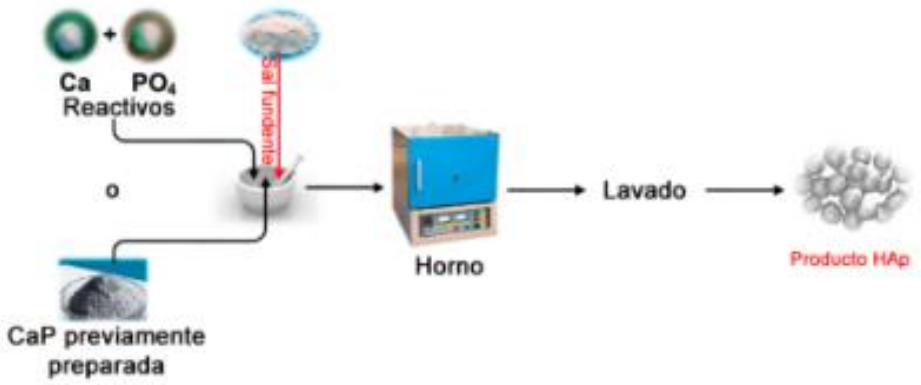


**Figura 1-5.** Reacción en estado sólido obtención HA (Sadat-Shojai et al., 2013)

*1.3.3.1.2.2. Método Químico - Mecánico*

En el método químico – mecánico los precursores de calcio y fosforo son pulverizados generalmente en un molino de bolas. Para el proceso de síntesis de HA se puede realizar molienda húmeda o seca (Adzila et al., 2011; Iwasaki, 2013; Shu et al., 2005). En la molienda húmeda se han empleado solventes como agua destilada, etanol y acetona (Iwasaki, 2013; Rhee, 2002; Yeong et al., 2001) y la molienda seca se realiza sin agregar ningún tipo de solvente. Cuando la síntesis se realiza sin la agregación de agua la reacción de los precursores es más rápida (El Briak-BenAbdeslam et al., 2008).

Otros parámetros como velocidad de rotación y tiempo de molienda, pueden afectar el resultado, obteniendo HA con diferentes morfologías, estequiometria y nivel de cristalinidad (Adzila et al., 2011).

La velocidad de rotación está relacionada con la cristalinidad de la muestra, cuando se incrementa la velocidad se sintetiza HA con mayor cristalinidad, asimismo, la alta velocidad reduce el tamaño de partícula (Adzila et al., 2011).

Además, cuando el tiempo de molienda aumenta el tamaño de partícula disminuye (Nasiri-Tabrizi et al., 2013)(Mandal et al., 2014)

**Figura 1-6.** Método Químico – Mecánico obtención HA (Sadat-Shojai et al., 2013)

### 1.3.3.2. Hidroxiapatita a partir de Fuentes Naturales

HA obtenida a partir de fuentes naturales ha adquirido gran interés debido a que los procesos de síntesis son de bajo costo, a comparación de la HA sintetizada químicamente donde parámetros como temperatura, pH y pureza de los reactivos iniciales son fundamentales y deben ser constantemente controlados para obtener HA estequiométrica de alta calidad (Akram et al., 2014; Liu et al., 2002), elevando los costos y tiempo requerido en su síntesis.

A partir de fuentes naturales se extrae HA no estequiométrica similar a la que se encuentra en la fase inorgánica de los huesos ya que presenta trazas de elementos como K, Na, Mg y F, haciendo que la HA sea más compatible con el hueso humano (Ramesh et al., 2016), además de ser fundamentales en el proceso de metabolismo óseo (Yoganand et al., 2011).

Diversos son los recursos naturales usados para extraer HA entre los más utilizados se encuentran las cascaras de huevos, corales y huesos de origen animal, donde en la mayoría de los casos se obtiene HA a partir de tratamiento térmico a altas temperaturas, evitando el uso de sustancias químicas (Khoo et al., 2015; Venkatesan et al., 2010).

En la actualidad se comercializa HA extraída a partir de corales y huesos de origen animal, las cuales son usadas como sustitutos óseos. En la Tabla 1-3 se pueden observar algunas de las marcas comercializadas de HA y la fuente natural de donde fue extraída.

**Tabla 1-3.** HA de origen animal Comercializada (Boskey, 2013)

| Producto | Fuente Natural |
|---|---|
| Bio-Oss | Hueso Bovino |
| Endobon | Hueso Bovino |
| Interpore 200 | Coral |
| NuOSS | Hueso Bovino Región Cortical |
| Pro-Osteon | Coral |
| Truebone | Hueso Bovino |
| Cerabone | Hueso Bovino |
| Apatos | Hueso Porcino |

#### 1.3.3.2.1. Cascaras de Huevos

La cascara de huevo está compuesta por carbonato de calcio ($CaCO_3$), fosfato de calcio y materia orgánica (Rivera et al., 1999), debido a esto es utilizada en la síntesis de HA ya que al ser calcinada a altas temperaturas se obtiene $CaO$, empleado como precursor de calcio en la síntesis (Kamalanathan et al., 2014), al cual se le adiciona una solución de fosfato de calcio $(Ca_3(PO_4)_2)$ donde las cantidades utilizadas no son perjudiciales para el medio ambiente (Rivera et al., 1999) y obtener HA de alta calidad. Entre los métodos utilizados para la síntesis se encuentra el de precipitación, hidrotérmico y reacción en estado sólido (Goloshchapov et al., 2013; Ramesh et al., 2016; Wu et al., 2013).

Reacción de $Ca_3(PO_4)_2$, $CaO$ y $H_2O$ para la obtención de HA (Rivera et al., 1999)

$$3Ca(PO_4)_2 + CaO + H_2O \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 \qquad (2)$$

HA sintetizada a partir de cascaras de huevos presenta una mejor osteoconductividad, comparada con la obtenida de otras fuentes ( Krishna et al., 2007)

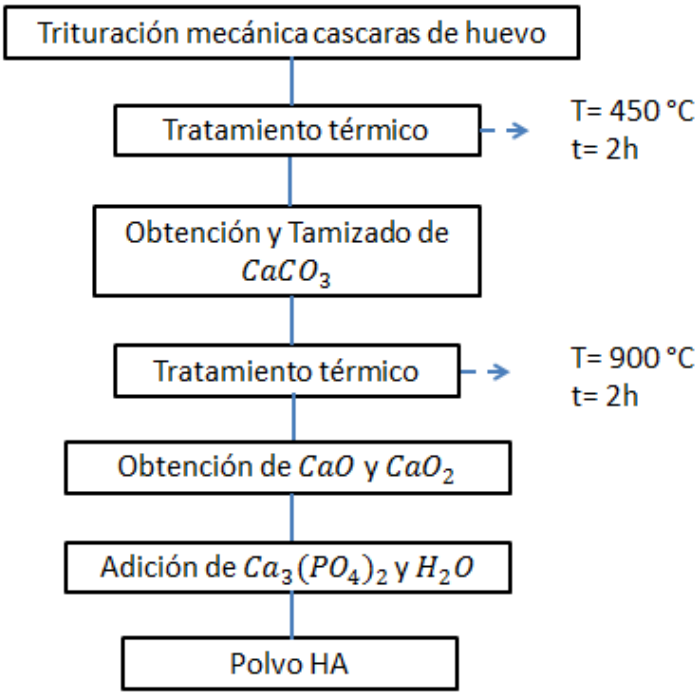


**Figura 1-7.** Proceso obtención HA a partir de cascara de huevo (Arboleda et al., 2016)

#### 1.3.3.2.2. Corales

El esqueleto de los corales está compuesto principalmente por $CaCO_3$, material utilizado como precursor de Ca en la obtención de HA.

El método más utilizado para la síntesis es el hidrotérmico, donde se calcina el esqueleto del coral para obtener $CaCO_3$ y se le adiciona una solución de Fosfato Diamónico ($(NH_4)_2HPO_4$), obteniendo HA sin impurezas (Nandi et al., 2015; Sivakumar et al., 1996).

Reacción de $CaCO_3$ y $(NH_4)_2HPO_4$ para la obtención de HA (Nandi et al., 2015b)

$$10CaCO_3 + 6(NH_4)_2HPO_4 + 2H_2O \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 6(NH_4)_2CO_3 + 4H_2CO_3 \quad (3)$$

HA obtenida a partir de corales ha sido utilizada como injertos de hueso, debido a que es un material poroso y permite la infiltración de vasos sanguíneos (Heness et al., 2004).

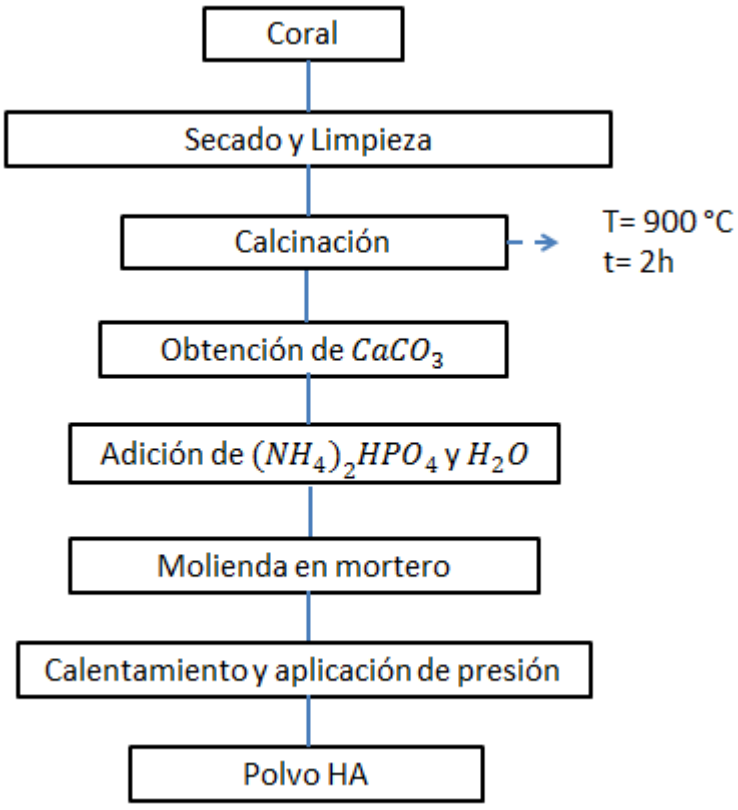


**Figura 1-8.** Proceso obtención HA a partir de esqueleto de coral (Sivakumar et al., 1996)

### 1.3.3.2.3. Huesos de Origen Animal

Huesos de pescado, porcinos y bovinos han sido ampliamente utilizados en la extracción de HA por ser materiales fáciles de conseguir y económicos (Goto et al., 2014; Niakan et al., 2015; Salamanca et al., 2015), además se obtiene HA de alta calidad. Entre los métodos más utilizados se encuentra el de calcinación donde dependiendo de la temperatura se puede obtener hidroxiapatita carbonatada ó hidroxiapatita con trazas de óxido de calcio $(CaO)$ (Goto et al., 2014; Sobczak-Kupiec et al., 2012), además, al aumentar la temperatura de calcinación la cristalinidad de la HA aumenta, obteniendo cristalitos con mayor tamaño (Ooi et al., 2007) y la estructura de la HA se vuelve menos porosa (Figueiredo et al., 2010).

Temperaturas mayores a 700°C producen la formación de $CaO$, cuando la relación $Ca/P > 1{,}67$ (Figueiredo et al., 2010; Sobczak-Kupiec et al., 2012); si la relación $Ca/P < 1{,}67$ se obtiene HA con deficiencia de calcio provocando la formación de fosfato tricálcico Beta $(\beta - \mathrm{TCP};\ \mathrm{Ca3(PO4)2})$ (Sobczak-Kupiec et al., 2012)

La eliminación de los compuestos orgánicos presentes en los huesos se da a temperaturas de calcinación alrededor de 600°C y temperaturas aproximadas a 800°C permiten obtener muestras libres de proteínas (Kamalanathan et al., 2014).

#### *1.3.3.2.3.1. Hueso de Pescado*

Huesos de pescado de diferentes especies han sido empleados para la extracción de HA, entre los que se encuentran peces espadas, atún y bacalao (Chattanathan, 2009; Piccirillo et al., 2013; Venkatesan et al., 2010). La calcinación de huesos de pescado generalmente da origen a la formación de hidroxiapatita Carbonatada (Goto et al., 2014). HA obtenida de huesos de pescado además de ser estudiada como posible material para ser usado en defectos óseos, ha sido empleada en la remoción de algunos metales como uranio, plomo y cadmio de agua subterránea contaminada (Chattanathan, 2009; Wright et al., 2003).

#### *1.3.3.2.3.2. Hueso Porcino*

El uso de sustitos óseos provenientes de porcino en tratamientos de implantes dentales han sido considerados debido a la similitud de los genomas humanos y porcinos. Obteniendo injertos de porcino que exhiben biocompatibilidad, bioabsorción y características de osteoconductividad, permitiendo una reparación ósea normal (Salamanca et al., 2015)

#### *1.3.3.2.3.3. Hueso Bovino*

Diferentes clases de hueso bovino han sido utilizados para extraer HA como tibia, humero y fémur (Bahrololoom et al., 2009; Gamelas et al., 2015). Los huesos bovinos se han empleado ya que la parte inorgánica está compuesta principalmente por HA (93%) y por fosfato tricálcico Beta (7%) (Kusrini et al., 2012).

Se puede obtener HA a partir de tratamiento térmico o mediante el uso de Hidróxido de Sodio $(NaOH)$ (Khoo et al., 2015; Mondal et al., 2012).Especialmente el tratamiento térmico es ampliamente usado debido que la calcinación de hueso permite evitar transmisión de enfermedades (Assaad, 2009).

La HA obtenida es biocompatible y bioactiva, pero una desventaja son las bajas propiedades mecánicas que posee, limitando su uso como biomaterial.

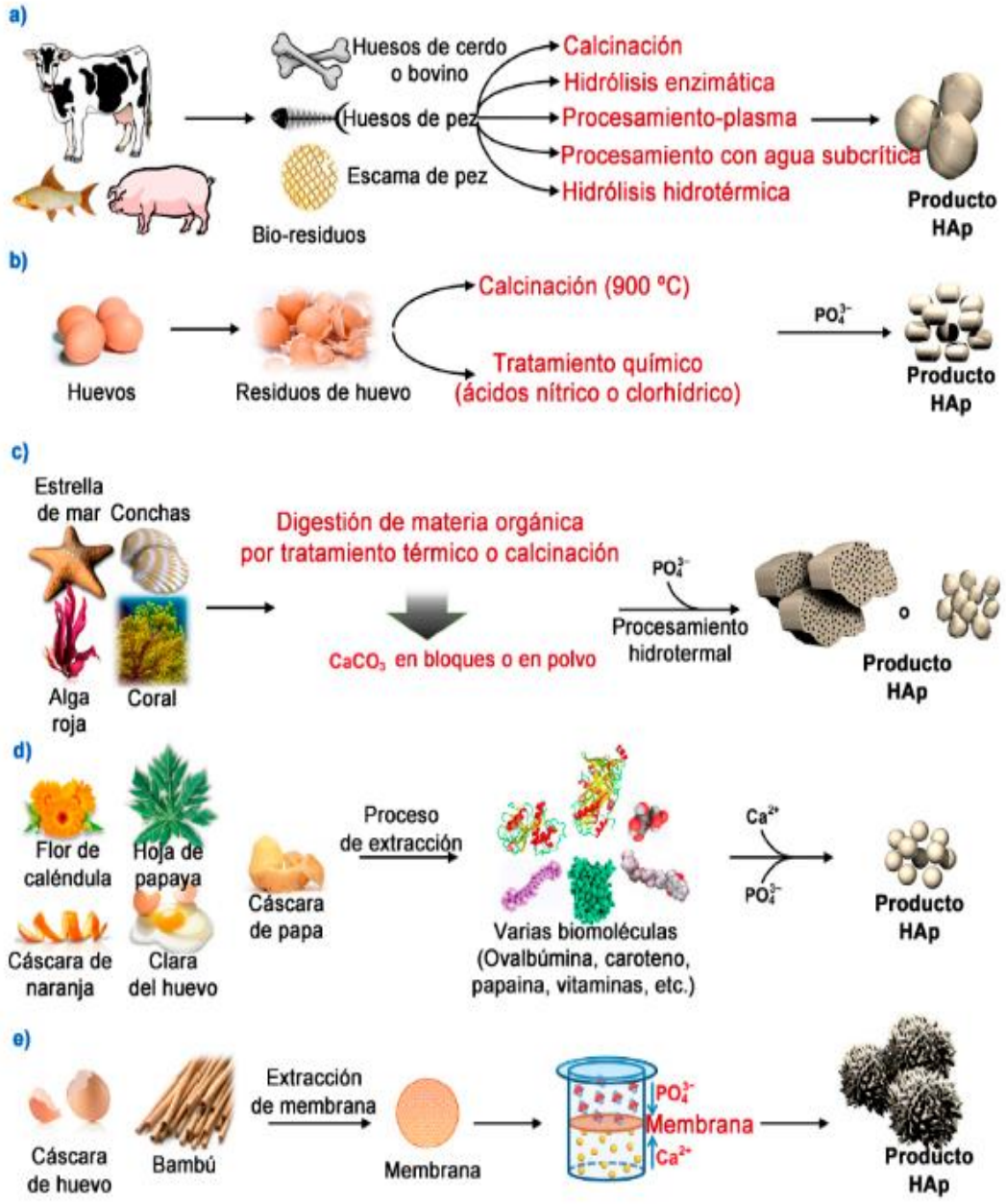


**Figura 1-9.** Extracción de HA a partir de Fuentes Naturales (Sadat-Shojai et al., 2013)

# Capítulo 2: Técnicas de Caracterización

En este capítulo se describen los conceptos básicos relacionados con cada una de las técnicas de caracterización empleadas para el estudio de la HA obtenida a partir de hueso fémur bovino y la HA dopada con ZnO

## 2.1. Difracción de Rayos X (DRX)

Al hacer incidir un haz de longitud de onda ($\lambda$) determinada sobre un material se produce una interacción entre la radiación y los átomos del cristal, actuando como un centro de dispersión.

La Ley de Bragg establece la condición necesaria para que ocurra la difracción, se puede expresar mediante la ecuación

$$n\lambda = 2dsen\theta \qquad (4)$$

Donde n es un número entero que representa el orden de difracción y d la distancia interplanar del cristal.

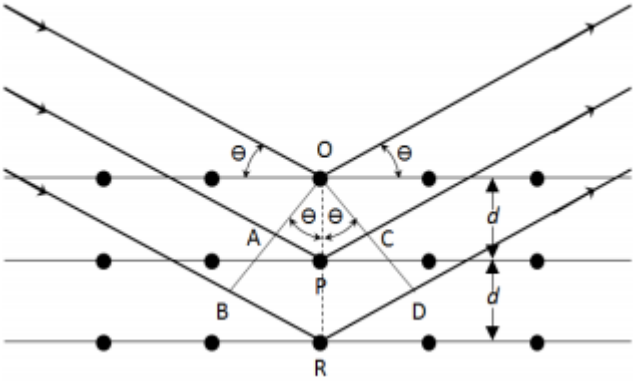


**Figura 2-1.** Esquema de la interacción de los rayos X y la estructura cristalina del material (Universidad Nacional de la Plata, 2012)

Los requisitos para que se produzca la difracción son que el espacio entre las capas atómicas sea aproximadamente igual a la longitud de onda de la radiación y que los centros de dispersión estén distribuidos de una manera regular.

Cada estructura cristalina tiene una relación característica de la distancia interplanar con los parámetros de red y los índices de Miller. Para una estructura Hexagonal la relación viene dada por la expresión

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{4}{3a^2}(h^2 + hk + k^2) + \frac{1}{c^2}l^2 \qquad (5)$$

Donde a y c son los parámetros de red de la estructura, h, k y l índices de Miller característicos de cada plano cristalográfico.

De los patrones de difracción se pueden obtener diversas características del material como parámetros de red de la estructura mediante el método de Cohen y tamaño de cristalito haciendo uso de la ecuación de Scherer.
A partir de la ley de Bragg y la relación de las distancias interplanares para una estructura hexagonal se pueden determinar los parámetros de red donde:

$$sen^2\theta = \frac{\lambda^2}{4d_{hkl}^2}$$

$$sen^2\theta = \frac{\lambda^2}{4}\left(\frac{4}{3a^2}(h^2 + hk + k^2) + \frac{1}{c^2}l^2\right)$$

$$sen^2\theta = \left(\frac{\lambda^2}{3a^2}\right)(h^2 + hk + k^2) + \left(\frac{\lambda^2}{4c^2}\right)(l^2)$$

Reescribiendo la ecuación se tiene

$$sen^2\theta_{hkl} = \alpha A + \gamma B \qquad (6)$$

Donde

$$\alpha = {}_h{}^2 + {}_h k + k^2 \qquad \gamma = l^2$$

$$A = \frac{\lambda^2}{3a^2} \qquad B = \frac{\lambda^2}{4c^2}$$

Multiplicando la expresión (6) por $\alpha$ y $\gamma$, se tiene un sistema de ecuaciones

$$\sum \alpha sen^2\theta_{hkl} = A\sum \alpha^2 + B\sum \alpha\gamma \qquad (7)$$

$$\sum \gamma sen^2\theta_{hkl} = A\sum \alpha\gamma + B\sum \gamma^2 \qquad (8)$$

Al resolver el sistema de ecuaciones se pueden determinar los valores de A y B, para encontrar los parámetros de red a y c.

El tamaño de cristalito se puede encontrar a partir de los patrones de difracción y haciendo uso de la de la ecuación de Scherer

$$t(hkl) = \frac{K\lambda}{Bcos\theta_{(hkl)}} \qquad (9)$$

Donde $t(hkl)$ es el tamaño promedio de cristalito, $\lambda$ es la longitud de onda de los rayos x empleados, $B$ es el ancho medio del pico con mayor intensidad, $\theta$ es el ángulo de difracción y $K$ es una constante que depende del material y tamaño del cristalito.

## 2.2. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Es una técnica utilizada para el estudio de la morfología de los materiales. Consiste en la interacción de un haz de electrones producido por un filamento caliente generalmente de tungsteno y una determinada área del material a estudiar, generando diferentes señales como la de electrones secundarios y retrodispersados, los cuales se diferencian por su energía.

Los electrones secundarios son generados por interacciones inelásticas, tienen una energía inferior a 50 eV y son utilizados para la formación de la imagen. Mientras que los electrones retrodispersados se dan por dispersiones elásticas, responden a la composición elemental de la muestra, generando un contraste por número atómico (zonas con número atómico menor se verán más oscuras).

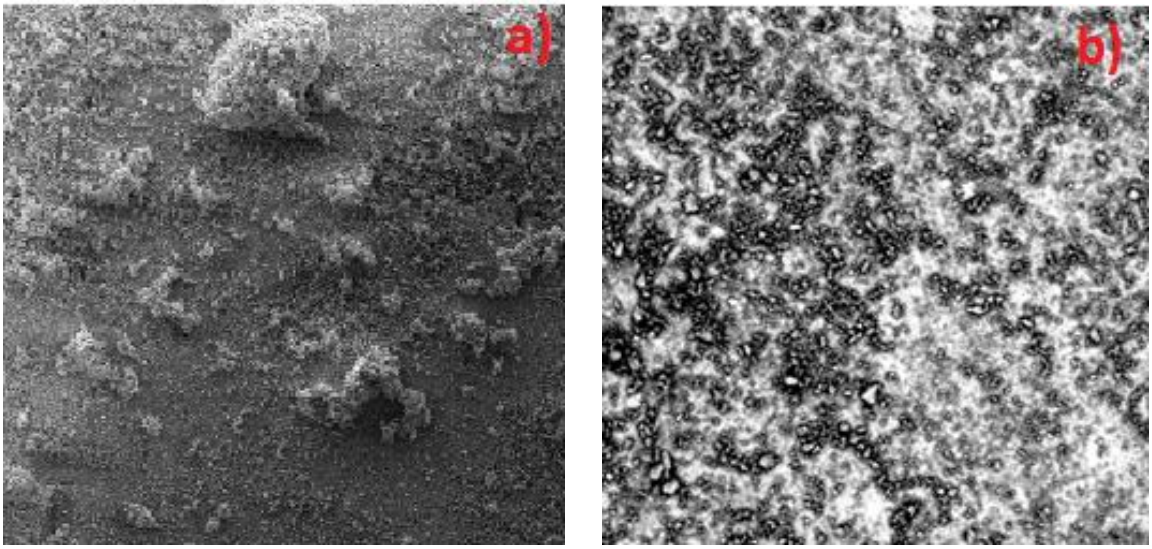


**Figura 2-2.** a) Imagen con electrones secundarios b) Imagen con electrones retrodispersados

El resultado mediante MEB será una imagen digital que dependiendo del equipo se puede lograr una resolución de hasta 5 nm.

Para el análisis las muestras deben de ser conductoras, cuando éstas no lo son se les hace un recubrimiento con algún material conductor como el oro. En algunos casos y dependiendo del equipo las muestras deben estar libres de humedad, por lo que en ocasiones es necesario realizarles un proceso de deshidratación.

## 2.3. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Es una técnica usada para la identificación de los grupos funcionales de las moléculas que componen el material, se basa en la excitación de los modos de vibración y rotación de los enlaces atómico cuando son irradiados con un haz de luz infrarroja, estudiando la absorción o transmisión de la energía radiante originada por la interacción de la radiación y el material a caracterizar.

La absorción de la radiación infrarroja por un analito se puede relacionar cuantitativamente con la concentración de la sustancia, siguiendo la ley de Lambert-Beer la cual se puede expresar de la siguiente manera:

$$A = log_{10} \frac{I_o}{If} = \varepsilon(\lambda)[B]L \qquad (10)$$

Donde A es la absorbancia (magnitud adimensional), $I_o$ e $I_f$ son las intensidades de radiación incidente y transmitida respectivamente, [B] es la concentración molar del analito, $\varepsilon(\lambda)$ es el coeficiente de absorción molar y L es el espesor de la sustancia.

Entre las ventajas de la técnica es que permite analizar casi todo tipo de muestra independiente de su estado y forma como líquidos, películas delgadas, fibras y polvos, y dependiendo del equipo no es necesario realizar ninguna preparación de la muestra, además se requiere un tiempo corto para la adquisición del espectro.

## 2.4. Espectroscopia Raman

Es una técnica fotónica que permite obtener información de la composición química del material a analizar. Se basa en el estudio de la radiación dispersada por el material al hacer incidir sobre éste un haz de luz monocromático.

Cuando la luz atraviesa una molécula o material se generan diversos efectos los cuales pueden ser estudiados a partir de los cambios generados por la luz. Un cambio que puede ser apreciable es el del momento dipolar eléctrico de la materia, el cual está relacionado con el campo eléctrico de la luz incidente. La relación del momento dipolar y el campo electromagnético se puede escribir como

$$\vec{P} = \alpha\vec{E} \qquad (11)$$

Expresando el campo eléctrico de la luz como:

$$E = E_0\cos(\omega_i t) \qquad (12)$$

Donde $\vec{P}$ es el momento dipolar, $\vec{E}$ es el campo eléctrico de la onda incidente y $\alpha$ es la polarizabilidad.

La dispersión Raman se da cuando una molécula tiende a distorsionarse de diferente forma en todas las posiciones de la nube electrónica, es decir tienen una polarizabilidad cambiante, cumpliéndose

$$\frac{d\alpha}{dq} \neq 0 \qquad (13)$$

Donde q es la posición de la molécula.

El comportamiento de la polarizabilidad se puede analizar utilizando Series de Taylor expresándola como:

$$\alpha = (\alpha_0)_{q=0} + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_{q=0} q + \frac{1}{2!}\left(\frac{d^2\alpha}{dq^2}\right)_{q=0} q^2 + \frac{1}{3!}\left(\frac{d^3\alpha}{dq^3}\right)_{q=0} q^3 = 0 \quad (14)$$

Escribiendo q de la forma:

$$q = q_0 \cos(\omega_m t) \quad (15)$$

Donde $q_0$ es la amplitud máxima y $\omega_m$ es la frecuencia de vibración de la molécula.

Tomando los dos primeros términos de la polarizabilidad se obtiene la expresión

$$P = (\alpha_0)_{q=0} E cos(\omega_i t) + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_{q=0} q_0 E_0 \cos(\omega_i)\cos(\omega_m) \quad (16)$$

Haciendo uso de la identidad trigonométrica $cos\theta cos\delta = \frac{1}{2}(\cos(\theta+\delta) + \cos(\theta-\delta))$

Reescribiendo la ecuación (16) se tiene

$$P = (\alpha_0)_{q=0} E cos(\omega_i t) + \frac{1}{2}\left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_{q=0} q_0 E_0 (\cos(\omega_i + \omega_m) + \cos(\omega_i - \omega_m)) \quad (17)$$

Donde el primer término hace referencia a la dispersión Rayleigh, teniendo la misma frecuencia de la radiación incidente, el segundo término representa la dispersión Anti-Stokes, con frecuencia mayor a la incidente, cediendo energía a la luz dispersada y el ultimo termino está relacionado con la dispersión Stokes, con frecuencia menor que el de la luz incidente, éstos dos últimos términos corresponden a la Dispersión Raman, de modo que para cada material se presenta una dispersión característica.

# Capítulo 5: Conclusiones

- HA no estequiométrica fue obtenida a partir de hueso bovino utilizando un método amigable con el medio ambiente, sencillo y de bajo costo.
- Se estudió el tipo de apatita presente en el hueso bovino, para la región cortical se obtiene apatita carbonata, mientras que para la región trabecular la apatita tiene deficiencia de calcio.
- A partir de la técnica Raman se puede observar que tanto la región cortical como la trabecular del hueso, presentan una fase orgánica compuesta principalmente por colágeno y una inorgánica la cual está constituida por apatita.
- Se realizó tratamiento térmico a la región cortical del hueso para extraer HA, mediante la técnica FTIR se observa que 800°C fue la temperatura adecuada para la eliminación de los compuestos orgánicos.
- Mediante el análisis EDS se observa que las muestras obtenidas están compuestas principalmente por calcio, fosforo y oxígeno, además de contener en menor cantidad trazas de magnesio.
- Al aumentar la temperatura de calcinación de hueso se produce HA más pura, disminuyendo la presencia de carbonatos en la red, además el tamaño del cristalito aumenta generando mejor cristalinidad en la muestras.
- Mediante la técnica de espectroscopia Raman se puede evidenciar que al aumentar la temperatura de calcinación aparecen bandas asociadas a los cuatro modos vibracionales del ion fosfato, teniendo una relación con la cristalinidad de la muestra.

- HA obtenida a 1000°C fue dopada con ZnO variando el porcentaje, mediante el análisis EDS se puede observar que las muestras están compuestas en mayor cantidad por calcio, fosforo, oxígeno y zinc. Además la relación molar Ca/P es menor a 1,67 evidenciando la obtención de HA con deficiencia de calcio.

- Al aumentar la cantidad ZnO incorporado en la estructura de la HA el tamaño de cristalito disminuye, sin embargo la muestras obtenidas siguen siendo cristalinas.

- Se evaluó la actividad antimicrobiana in vitro mediante el método de difusión en disco, frente a Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa.

- La incorporación de ZnO a la estructura de la HA mejora las propiedades antimicrobianas frente a microorganismos como Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa. Generando halos de inhibición, cuando se expone este material frete a los microorganismos.

- HA extraída a 1000°C no presenta actividad antimicrobiana cuando se enfrenta a Staphylococcus aureus, mientras que para Pseudomonas aeruginosa se generan halos de inhibición con un diámetro promedio de 23,5 mm.

- El mayor porcentaje de inhibición frente a Staphylococcus aureus se obtuvo con la HA dopada con 5% de ZnO, mientras que para Pseudomonas aeruginosa el mayor porcentaje de inhibición lo presento la HA dopada con 10% de ZnO.

# Ponencias en Eventos

**Caracterización estructural y de composición de hueso tipo fémur vacuno.**
XXIV Congreso Nacional de Física
Bogotá (3 al 7 de octubre de 2011)

**Caracterización estructural, vibracional y mecánica de hueso tipo fémur**
III Congreso Nacional de Ingeniería Física
Medellín (10 al 14 de septiembre de 2012)

**Extracción de hidroxiapatita bioceramica natural e incorporación de Zinc por intercambio iónico**
XXV Congreso Nacional de Física
Armenia (29 de agosto de 2013)

**Estudios de pureza de hidroxiapatita natural mediante métodos de análisis cuantitativo**
IV Congreso Nacional de Ingeniería Física
Popayán (22 al 26 de septiembre de 2014)

**Obtención y caracterización de hidroxiapatita natural variando el tiempo de calcinación**
IV Congreso Nacional de Ingeniería Física
Popayán (22 al 26 de septiembre de 2014)

# Referencias


Abidi, S. S. A., & Murtaza, Q. (2014a). Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction. *Journal of Materials Science and Technology*, *30*(4), 307–310. http://doi.org/10.1016/j.jmst.2013.10.011

Abidi, S. S. A., & Murtaza, Q. (2014b). Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction. *Journal of Materials Science and Technology*, *30*(4), 307–310. http://doi.org/10.1016/j.jmst.2013.10.011

Adzila, S., Sopyan, I., & Hamdi, M. (2011). Mechanochemical Synthesis of Hydroxyapatite Nanopowder: Effects of Rotation Speed and Milling Time on Powder Properties. *Applied Mechanics and Materials*, *110-116*, 3639–3644. http://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.110-116.3639

Ager, J. W., Nalla, R. K., Breeden, K. L., & Ritchie, R. O. (2005). Deep-ultraviolet Raman spectroscopy study of the effect of aging on human cortical bone. *Journal of Biomedical Optics*, *10*(3), 34012. http://doi.org/10.1117/1.1924668

Agrawal, K., Singh, G., Puri, D., & Prakash, S. (2011). Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Powder by Sol-Gel Method for Biomedical Application. *J Minerals Materials Char Eng*, *10*(8), 727–734. http://doi.org/10.4236/jmmce.2011.108057

Akram, M., Ahmed, R., Shakir, I., Ibrahim, W. A. W., & Hussain, R. (2014). Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources. *Journal of Materials Science*, *49*(4), 1461–1475. http://doi.org/10.1007/s10853-013-7864-x

Anita Lett, J., Sundareswari, M., & Ravichandran, K. (2016). Porous hydroxyapatite scaffolds for orthopedic and dental applications - the role of binders. *Materials Today: Proceedings*, *3*(6), 1672–1677. http://doi.org/10.1016/j.matpr.2016.04.058

Ansari, M., Naghib, S. M., Moztarzadeh, F., & Salati, A. (2011). Synthesis and characterization of hydrxyapatite calcium hydroxide for dental composites. *Ceramics*, *67*(Figure 5), 123–126.

Arboleda, A., Franco, M., Caicedo, J., & Goyes, C. (2016). Synthesis and chemical and structural

characterization of hydroxyapatite obtained from eggshell and tricalcium phosphate sintetizada a partir de cáscara de huevo y fosfato tricálcico, *71*(1), 69–71.

Arkin, V. H., Lakhera, M., Manjubala, I., & Kumar, U. N. (2015). Solid state synthesis and characterization of calcium phosphate for biomedical application, *8*(6), 264–267.

Assaad, M. (2009). Bone and Tissue Regeneration Insights properties of Hydroxyapatite from Bovine Teeth. *Bone and Tissue Regeneration Insights*, *2*, 31–36. http://doi.org/10.4137/BTRI.S3728

Awonusi, A., Morris, M. D., & Tecklenburg, M. M. J. (2007). Carbonate assignment and calibration in the Raman spectrum of apatite. *Calcified Tissue International*, *81*(1), 46–52. http://doi.org/10.1007/s00223-007-9034-0

Bahrololoom, M. E., Javidi, M., Javadpour, S., & Ma, J. (2009). Characterisation of natural hydroxyapatite extracted from bovine cortical bone ash. *Journal of Ceramic Processing Research*, *10*(2), 129–138.

Beganskien, A., Dudko, O., Sirutkaitis, R., & Giraitis, R. (2006). Water Based Sol-Gel Synthesis of Hydroxyapatite, *9*(4), 4–7.

Boskey, A. L. (2013). *Natural and Synthetic Hydroxyapatites*. *Biomaterials Science* (Third Edit). Elsevier. http://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00017-6

Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R., & Recker, R. (1996a). Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instructional Course Lectures*, *45*, 371–86. http://doi.org/10.3390/jfb1010022

Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R., & Recker, R. (1996b). Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instructional Course Lectures*, *45*, 387–399. http://doi.org/8727758

Chai, C. S., Gross, K. a, & Ben-Nissan, B. (1998). Critical ageing of hydroxyapatite sol-gel solutions. *Biomaterials*, *19*(24), 2291–2296. http://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)90138-7

Chao Wang. (2012). Antibacterial effects of zinc oxide nanoparticles on Escherichia coli K88. *African Journal of Biotechnology*, *11*(44), 10248–10254. http://doi.org/10.5897/AJB11.3703

Chattanathan, S. A. (2009). *Use of Hydroxyapatite Derived From Catfish Bones for Remediating Uranium Contaminated Groundwater*.

Cho, J. S., Yoo, D. S., Chung, Y. C., & Rhee, S. H. (2014). Enhanced bioactivity and osteoconductivity of hydroxyapatite through chloride substitution. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *102*(2), 455–469. http://doi.org/10.1002/jbm.a.34722

Claudia García, Carlos Paucar, J. G. (2006). Study of Some Parameters That Determine the Synthesis of Hydroxyapatite By the Precipitation Route. *Dyna*, *73*(148), 9–15.

Cowin, S., & Telega, J. (2003). Bone Mechanics Handbook, 2nd Edition. -. In *Applied Mechanics Reviews* (Vol. 56, p. B61). http://doi.org/10.1115/1.1579463

Crane, N. J., Popescu, V., Morris, M. D., Steenhuis, P., & Ignelzi, M. A. (2006). Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization. *Bone*, *39*(3), 434–442. http://doi.org/10.1016/j.bone.2006.02.059

Deepa, C., Begum, a N., & Aravindan, S. (2013). Preparation and Antimicrobial Observations of Zinc Doped Nanohydroxyapatite. *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics*, *4*(3), 370–377.

Dong, R., Yan, X., Pang, X., & Liu, S. (2004). Temperature-dependent Raman spectra of collagen and DNA. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *60*(3), 557–561. http://doi.org/10.1016/S1386-1425(03)00262-2

Earl, J. S., Wood, D. J., & Milne, S. J. (2006). Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite. *Journal of Physics: Conference Series*, *26*, 268–271. http://doi.org/10.1088/1742-6596/26/1/064

El Briak-BenAbdeslam, H., Ginebra, M. P., Vert, M., & Boudeville, P. (2008). Wet or dry mechanochemical synthesis of calcium phosphates? Influence of the water content on DCPD-CaO reaction kinetics. *Acta Biomaterialia*, *4*(2), 378–386. http://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.07.003

Fadli, A., Akbar, F., Putri, P., Pratiwi, D. I., & Muhara, I. (2014). Hydroxyapatite Powder Prepared by Low Temperature Hydrothermal Method from Sea Shells, 24–29.

Ferraz, M. P., Monteiro, F. J., & Manuel, C. M. (2004). Hydroxyapatite nanoparticles : A review of. *Journal of Applied Biomaterials*, *2*(2), 74–80. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20803440

Figueiredo, M., Fernando, A., Martins, G., Freitas, J., Judas, F., & Figueiredo, H. (2010). Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone. *Ceramics International*, *36*(8), 2383–2393. http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2010.07.016

Frost, R. L., Reddy, B. J., Martens, W. N., & Weier, M. (2006). The molecular structure of the phosphate mineral turquoise-a Raman spectroscopic study. *Journal of Molecular Structure*, *788*(1-3), 224–231. http://doi.org/10.1016/j.molstruc.2005.12.003

Fujisaki, K., Tadano, S., & Sasaki, N. (2006). A method on strain measurement of HAP in cortical bone from diffusive profile of X-ray diffraction. *Journal of Biomechanics*, *39*(3), 579–586. http://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2005.01.001

Gamelas, J. A. F., & Martins, A. G. (2015). Surface properties of carbonated and non-carbonated hydroxyapatites obtained after bone calcination at different temperatures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *478*, 62–70. http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.03.044

Garza-Velasco, R., Zúñiga-Rangel, O., & Perea-Mejía, L. M. (2013). La importancia clínica actual de Staphylococcus aureus en el ambiente intrahospitalario. *Educación Química*, *24*(1), 8–13.

Gergely, G., W??ber, F., Luk??cs, I., T??th, A. L., Horv??th, Z. E., Mih??ly, J., & Bal??zsi, C. (2010). Preparation and characterization of hydroxyapatite from eggshell. *Ceramics International*, *36*(2), 803–806. http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2009.09.020

Goloshchapov, D. L., Kashkarov, V. M., Rumyantseva, N. A., Seredin, P. V., Lenshin, A. S., Agapov, B. L., & Domashevskaya, E. P. (2013). Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by precipitation using hen's eggshell. *Ceramics International*, *39*(4), 4539–4549. http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.11.050

Gorres, K. L., & Raines, R. T. (2010). Prolyl 4-Hydroxylase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *45*(2), 106–124. http://doi.org/10.3109/10409231003627991.Prolyl

Goto, T., & Sasaki, K. (2014). Effects of trace elements in fish bones on crystal characteristics of hydroxyapatite obtained by calcination. *Ceramics International*, *40*(7 PART B), 10777–10785. http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.03.067

Guang, S., Ke, F., & Shen, Y. (2015). Controlled Preparation and Formation Mechanism of Hydroxyapatite Nanoparticles under Different Hydrothermal Conditions. *Journal of Materials Science and Technology*, *31*(8), 852–856. http://doi.org/10.1016/j.jmst.2014.12.013

Guo, X., Yan, H., Zhao, S., Li, Z., Li, Y., & Liang, X. (2013). Effect of calcining temperature on particle size of hydroxyapatite synthesized by solid-state reaction at room temperature. *Advanced Powder Technology*, *24*(6), 1034–1038. http://doi.org/10.1016/j.apt.2013.03.002

Guzmán Vázquez, C., Piña Barba, C., & Munguía, N. (2005). Stoichiometric hydroxyapatite obtained by precipitation and sol gel processes. *Revista Mexicana de Fisica*, *51*(3), 284–293.

Hench, L. L. ., & Wilson, J. (1993). An Introduction to Bioceramics. *World Scientific*, 41–75. http://doi.org/10.1142/9781908977168_0021

Heness, G., & Ben-Nissan, B. (2004). Innovative bioceramics. *Materials Forum*, *27*(2004), 104–114.

Hsieh, M. F., Perng, L. H., Chin, T. S., & Perng, H. G. (2001). Phase purity of sol-gel-derived hydroxyapatite ceramic. *Biomaterials*, *22*(19), 2601–2607. http://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00448-8

Iwasaki, T. (2013). Mechanochemical Synthesis of Magnetite / Hydroxyapatite Nanocomposites for Hyperthermia. *Materials Science - Advanced Topics*, 175. http://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/54344

Jin, X., Chen, X., Cheng, Y., Wang, L., Hu, B., & Tan, J. (2015). Effects of hydrothermal temperature and time on hydrothermal synthesis of colloidal hydroxyapatite nanorods in the presence of sodium citrate. *Journal of Colloid and Interface Science*, *450*, 151–158. http://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.03.010

Jones, N., Ray, B., Ranjit, K. T., & Manna, A. C. (2008). Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, *279*(1), 71–76. http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01012.x

Kamalanathan, P., Ramesh, S., Bang, L. T., Niakan, A., Tan, C. Y., Purbolaksono, J., … Teng, W. D. (2014). Synthesis and sintering of hydroxyapatite derived from eggshells as a calcium precursor. *Ceramics International*, *40*(PB), 16349–16359. http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.07.074

Khoo, W., Nor, F. M., Ardhyananta, H., & Kurniawan, D. (2015). Preparation of Natural Hydroxyapatite from Bovine Femur Bones Using Calcination at Various Temperatures. *Procedia Manufacturing*, *2*(February), 196–201. http://doi.org/10.1016/j.promfg.2015.07.034

Kusrini, E., Pudjiastuti, A. R., Astutiningsih, S., & Harjanto, S. (2012). Preparation of Hydroxyapatite from Bovine Bone by Combination Methods of Ultrasonic and Spray Drying. *B*.

Liu, D. M., Yang, Q., Troczynski, T., & Tseng, W. J. (2002). Structural evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite. *Biomaterials*, *23*(7), 1679–1687. http://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00295-2

Liu, Y., He, L., Mustapha, A., Li, H., Hu, Z. Q., & Lin, M. (2009). Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(4), 1193–1201. http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04303.x

Lu, X., Zhang, H., Guo, Y., Wang, Y., Ge, X., Leng, Y., & Watari, F. (2011). Hexagonal hydroxyapatite

formation on TiO2 nanotubes under urea modulation. *CrystEngComm*, *13*(11), 3741. http://doi.org/10.1039/c0ce00971g

Mandal, T., Mishra, B. K., Garg, A., & Chaira, D. (2014). Optimization of milling parameters for the mechanosynthesis of nanocrystalline hydroxyapatite. *Powder Technology*, *253*, 650–656. http://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.12.026

Manoharan, R., Wang, Y., & Feld, M. S. (1996). Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *52*(2), 215–249. http://doi.org/10.1016/0584-8539(95)01573-6

Miller, L. M., Vairavamurthy, V., Chance, M. R., Mendelsohn, R., Paschalis, E. P., Betts, F., & Boskey, a L. (2001). In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the nu(4) PO(4)(3-) vibration. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1527*(1-2), 11–19. http://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00093-9

Mondal, S., Mondal, B., Dey, A., & Mukhopadhyay, S. S. (2012). Studies on Processing and Characterization of Hydroxyapatite Biomaterials from Different Bio Wastes. *Journal of Minerals and Materials Characterization & Engineering*, *11*(1), 55–67.

Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I. U. (2007). Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, *42*(5), 493–541. http://doi.org/10.1080/05704920701551530

Nakano, T., Kaibara, K., Tabata, Y., Nagata, N., Enomoto, S., Marukawa, E., & Umakoshi, Y. (2002). Unique alignment and texture of biological apatite crystallites in typical calcified tissues analyzed by microbeam x-ray diffractometer system. *Bone*, *31*(4), 479–487. http://doi.org/10.1016/S8756-3282(02)00850-5

Nandi, S. K., Kundu, B., Mukherjee, J., Mahato, A., Datta, S., & Balla, V. K. (2015a). Converted marine coral hydroxyapatite implants with growth factors: In vivo bone regeneration. *Materials Science and Engineering C*, *49*, 816–823. http://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.078

Nandi, S. K., Kundu, B., Mukherjee, J., Mahato, A., Datta, S., & Balla, V. K. (2015b). Converted marine coral hydroxyapatite implants with growth factors: In vivo bone regeneration. *Materials Science and Engineering C*, *49*, 816–823. http://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.078

Nasiri-Tabrizi, B., Fahami, A., & Ebrahimi-Kahrizsangi, R. (2013). Effect of milling parameters on the formation of nanocrystalline hydroxyapatite using different raw materials. *Ceramics International*, *39*(5), 5751–5763. http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.12.093

Niakan, A., Ramesh, S., Ganesan, P., Tan, C. Y., Purbolaksono, J., Chandran, H., … Teng, W. D. (2015). Sintering behaviour of natural porous hydroxyapatite derived from bovine bone. *Ceramics International*, *41*(2), 3024–3029. http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.10.138

Ooi, C. Y., Hamdi, M., & Ramesh, S. (2007). Properties of hydroxyapatite produced by annealing of bovine bone. *Ceramics International*, *33*(7), 1171–1177. http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2006.04.001

Orlovskii, V. P., Komlev, V. S., & Barinov, S. M. (2002). Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics. *Inorganic Materials*, *38*(10), 973–984. http://doi.org/10.1023/A:1020585800572

Owens, G. J., Singh, R. K., Foroutan, F., Alqaysi, M., Han, C. M., Mahapatra, C., … Knowles, J. C. (2016). Sol-gel based materials for biomedical applications. *Progress in Materials Science*, *77*, 1–79. http://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.12.001

Penel, G., Delfosse, C., Descamps, M., & Leroy, G. (2005). Composition of bone and apatitic biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy. *Bone*, *36*(5), 893–901. http://doi.org/10.1016/j.bone.2005.02.012

Piccirillo, C., Silva, M. F., Pullar, R. C., Braga Da Cruz, I., Jorge, R., Pintado, M. M. E., & Castro, P. M. L. (2013). Extraction and characterisation of apatite- and tricalcium phosphate-based materials from cod fish bones. *Materials Science and Engineering C*, *33*(1), 103–110. http://doi.org/10.1016/j.msec.2012.08.014

Popa, C. L., Bartha, C. M., Albu, M., Guegan, R., Montelicaheino, M., Chifiriuc, M. C., … Antohe, S. (2015). Synthesis, Characterization and Cytotoxicity Evaluation on Zinc Doped Hydroxyapatite in Collagen Matrix. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, *10*(2), 681–691.

Ramesh, S. et. a. (2010). The influence of Ca/P ratio on the properties of hydroxyapatite bioceramics, (OCTOBER), 0–6. http://doi.org/10.1117/12.779890

Ramesh, S., Natasha, A. N., Tan, C. Y., Bang, L. T., Ramesh, S., Ching, C. Y., & Chandran, H. (2016). Direct conversion of eggshell to hydroxyapatite ceramic by a sintering method. *Ceramics International*, *42*(6), 7824–7829. http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.02.015

Rau, J. V., Cacciotti, I., De Bonis, A., Fosca, M., Komlev, V. S., Latini, A., … Teghil, R. (2014). Fe-doped hydroxyapatite coatings for orthopedic and dental implant applications. *Applied Surface Science*, *307*, 301–305. http://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.04.030

Reddy, K. M., Feris, K., Bell, J., Wingett, D. G., Hanley, C., & Punnoose, A. (2007). Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied Physics Letters*,

*90*(21). http://doi.org/10.1063/1.2742324

Rehman, I., & Bonfield, W. (1997). Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *8*(1), 1–4. http://doi.org/10.1023/A:1018570213546

Rhee, S. H. (2002). Synthesis of hydroxyapatite via mechanochemical treatment. *Biomaterials*, *23*(4), 1147–1152. http://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00229-0

Rivera, E. M., Araiza, M., Brostow, W., Castaño, V. M., Díaz-Estrada, J. R., Hernández, R., & Rodríguez, J. R. (1999). Synthesis of hydroxyapatite from eggshells. *Materials Letters*, *41*(3), 128–134. http://doi.org/10.1016/S0167-577X(99)00118-4

Rodrigues, L. R., D` Ávila, M. A., Monteiro, F. J. M., & Zavaglia, C. A. D. C. (2012). Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite gel and its application as scaffold aggregation. *Materials Research*, *15*(6), 974–980. http://doi.org/10.1590/S1516-14392012005000124

Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., Dinpanah-Khoshdargi, E., & Jamshidi, A. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, *9*(8), 7591–7621. http://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012

Saeri, M. R., Afshar, A., Ghorbani, M., Ehsani, N., & Sorrell, C. C. (2003). The wet precipitation process of hydroxyapatite. *Materials Letters*, *57*(24-25), 4064–4069. http://doi.org/10.1016/S0167-577X(03)00266-0

Sahar, N. D., Hong, S. I., & Kohn, D. H. (2005). Micro- and nano-structural analyses of damage in bone. *Micron*. http://doi.org/10.1016/j.micron.2005.07.006

Sahin, E. (2006). *Synthesis and Characterization of*. *Components*.

Salamanca, E., Lee, W.-F., Lin, C.-Y., Huang, H.-M., Lin, C.-T., Feng, S.-W., & Chang, W.-J. (2015). A Novel Porcine Graft for Regeneration of Bone Defects. *Materials*, *8*, 2523–2536. http://doi.org/10.3390/ma8052523

Sequeda, L. G., Díaz, J. M., Gutiérrez, S. J., Perdomo, S. J., & Gómez, O. L. (2012). Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo. *Revista Colombiana Ciencia, Química Y Farmaceutica. Farmacia Unal*, *41*(1), 50–66. Retrieved from http://www.farmacia.unal.edu.co/unciencias/data-file/user_66/V41N1-04 -2012.pdf

Shu, C., Yanwei, W., Hong, L., Zhengzheng, P., & Kangde, Y. (2005). Synthesis of carbonated hydroxyapatite nanofibers by mechanochemical methods. *Ceramics International*, *31*(1),

135–138. http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2004.04.012

Siva Rama Krishna, D., Siddharthan, A., Seshadri, S. K., & Sampath Kumar, T. S. (2007). A novel route for synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from eggshell waste. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *18*(9), 1735–1743. http://doi.org/10.1007/s10856-007-3069-7

Sivakumar, M., Sampath Kumar, T. S., Shantha, K. L., & Panduranga Rao, K. (1996). Development of hydroxyapatite derived from Indian coral. *Biomaterials*, *17*(17), 1709–1714. http://doi.org/10.1016/0142-9612(96)87651-4

Sobczak, A., Kowalski, Z., & Wzorek, Z. (2009). Preparation of hydroxyapatite from animal bones. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, *11*(4), 23–28.

Sobczak-Kupiec, A., & Wzorek, Z. (2012). The influence of calcination parameters on free calcium oxide content in natural hydroxyapatite. *Ceramics International*, *38*(1), 641–647. http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.06.065

Sopyan, I., Singh, R., & Hamdi, M. (2008). Synthesis of nano sized hydroxyapatite powder using sol-gel technique and its conversion to dense and porous bodies. *Indian Journal of Chemistry - Section A Inorganic, Physical, Theoretical and Analytical Chemistry*, *47*(11), 1626–1631.

Universidad Nacional de la Plata. (2012). Técnicas de Caracterización. Conceptos Generales. Capítulo IV. In *Sedici* (pp. 1–21). Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2681/IV_-_

Venkatesan, J., & Kim, S. K. (2010). Effect of temperature on isolation and characterization of hydroxyapatite from tuna (thunnus obesus) bone. *Materials*, *3*(10), 4761–4772. http://doi.org/10.3390/ma3104761

Wang, M. C., Chen, H. T., Shih, W. J., Chang, H. F., Hon, M. H., & Hung, I. M. (2015). Crystalline size, microstructure and biocompatibility of hydroxyapatite nanopowders by hydrolysis of calcium hydrogen phosphate dehydrate (DCPD). *Ceramics International*, *41*(2), 2999–3008. http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.10.135

Wang, X. Y., Zuo, Y., Huang, D., Hou, X. D., & Li, Y. B. (2010). Comparative study on inorganic composition and crystallographic properties of cortical and cancellous bone. *Biomedical and Environmental Sciences*, *23*(6), 473–480. http://doi.org/10.1016/S0895-3988(11)60010-X

Wopenka, B., & Pasteris, J. D. (2005). A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering C*, *25*(2), 131–143. http://doi.org/10.1016/j.msec.2005.01.008

Wright, J., & Conca, J. L. (2003). Remediation of groundwater contaminated with Zn, Pb and Cd using Apatite II. *Acta Mineralogica-Petrographica*, *Abstract S*(1997), 1p.

Wu, S. C., Tsou, H. K., Hsu, H. C., Hsu, S. K., Liou, S. P., & Ho, W. F. (2013). A hydrothermal synthesis of eggshell and fruit waste extract to produce nanosized hydroxyapatite. *Ceramics International*, *39*(7), 8183–8188. http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.03.094

Yeong, K. C. B., Wang, J., & Ng, S. C. (2001). Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from CaO and CaHPO4. *Biomaterials*, *22*(20), 2705–2712. http://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00257-X

Yoganand, C. P., Selvarajan, V., Goudouri, O. M., Paraskevopoulos, K. M., Wu, J., & Xue, D. (2011). Preparation of bovine hydroxyapatite by transferred arc plasma. *Current Applied Physics*, *11*(3), 702–709. http://doi.org/10.1016/j.cap.2010.11.035