



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE BIOCOMPÓSITOS DE HIDROXIAPATITA- WOLLASTONITA PREPARADOS MEDIANTE UNA TÉCNICA SOL-GEL ALTERNATIVA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

PRESENTA:

JESUS PERALTA HALEY

DIRECTOR: DR. MARTIN ANTONIO ENCINAS ROMERO

Hermosillo, Sonora

Noviembre, 2016

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



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

OFICIO DE APROBACIÓN DEL JURADO

OFICIO DE AUTORIZACIÓN DE EXAMEN DE GRADO

RESUMEN

La Hidroxiapatita es un tipo de material a base de fosfatos de calcio con gran interés para las aplicaciones biomédicas, debido a la similitud química que presenta este material a la parte mineral del hueso humano. Sin embargo, la Hidroxiapatita sintética es esencialmente frágil; la práctica indica que el uso de Hidroxiapatita sin aditivos para la producción de implantes no es eficiente, debido a su baja resistencia. En el presente trabajo, se sintetizaron biocompósitos de Hidroxiapatita-Wollastonita mediante una ruta sol-gel alternativa, utilizando Nitrato de Calcio y Fosfato de Amonio como precursores de Hidroxiapatita, y se añadió Wollastonita natural de alta pureza en proporciones de 20, 50 y 80 por ciento en peso inmersos en medio acuoso. La formación de Hidroxiapatita se produce a una temperatura relativamente baja de aproximadamente 350 °C, mientras que la Wollastonita permanece sin reaccionar. Posteriormente, estos biocompósitos se sinterizaron a 1200 °C durante 5 h para producir materiales densos. Las técnicas de caracterización demostraron la presencia de Hidroxiapatita y Wollastonita como fases únicas en todos los productos.

Para evaluar las propiedades biológicas de los biocompósitos *in vitro* se realizaron las pruebas de Bioactividad, mediante la interacción de los materiales con un fluido fisiológico simulado (SBF), similar a la carga iónica del plasma sanguíneo. El análisis de bioactividad de los biocompósitos, mediante su interacción con un fluido fisiológico simulado, durante varios periodos de tiempo, reveló la formación de una capa de apatita neoformada sobre sus superficies, similares a las apatitas biológicas que componen el tejido óseo. La proporción de Wollastonita en los materiales, repercutió en su respuesta bioactiva de manera favorable.

ABSTRACT

Hydroxyapatite is a type of calcium phosphate-based material with great interest for biomedical applications, due to the chemical similarity between this material and the mineral part of human bone. However, synthetic hydroxyapatite is essentially brittle; the practice indicates that the use of hydroxyapatite without additives for implant production is not efficient, due to its low strength parameters. In the present work, biocomposites of hydroxyapatite-wollastonite were synthesized by an alternative sol-gel route, using calcium nitrate and ammonium phosphate as precursors of hydroxyapatite, and high purity natural wollastonite added in ratios of 20, 50 and 80 percent by weight immersed in aqueous medium. Formation of hydroxyapatite occurs at a relatively low temperature of about 350°C, while the wollastonite remains unreacted. After that, these biocomposites were sintered at 1200°C for 5 h to produce dense materials. The characterization techniques demonstrated the presence of hydroxyapatite and wollastonite as unique phases in all products.

DEDICATORIA

A Dios y a mis Padres:

Olivia Kaley Garcia y Florenciano Peralta Patricio.

“Pon en manos del Señor todas tus obras, y tus proyectos se cumplirán”.

Proverbios 16:3

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	IV
ABSTRACT	IV
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABLAS	XI
AGRADECIMIENTOS	XII
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Objetivo General.....	4
1.3 Objetivos Específicos.....	4
CAPÍTULO 2	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Biomateriales.....	6
2.1.1 Clasificación de los Biomateriales	7
2.2 Hidroxiapatita.....	13
2.3 Wollastonita	15
2.4 Fluido Fisiológico Simulado.....	19
2.4.1Diseño de la Solución de Fluido Fisiológico Simulado (SBF).....	20
2.4.2 Análisis de Bioactividad en Materiales de Implante.....	22
2.5 Proceso Sol-Gel.....	24
CAPÍTULO 3	26
MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Síntesis y caracterización de biocompuestos de Hidroxiapatita-Wollastonita	26
3.1.1 Técnicas de Análisis	31
3.2 Sinterización de los biocompuestos de Hidroxiapatita-Wollastonita	33
3.3 Evaluación de las propiedades bioactivas de los biocompuestos de Hidroxiapatita-Wollastonita.	34

CAPÍTULO 4	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1 Artículo	38
CAPÍTULO 5	57
CONCLUSIONES	57
5.1 Conclusiones.....	57
CAPÍTULO 6	59
BIBLIOGRAFÍA	59
ANEXOS	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la hidroxiapatita $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$. Departamento de Química, Universidad del Estado de Moscú (15).....	14
Figura 2. Wollastonita natural.....	16
Figura 3. Morfología acicular típica de la Wollastonita.....	17
Figura 4. Estructura de la Wollastonita, CaSiO_3 : (a) Cadena de SiO_4 , (b) Estructura cristalina, (c) Ejes cristalográficos de una estructura triclinica.....	18
Figura 5. Proceso de agitación ultrasónica.....	27
Figura 6. Imagen del procedimiento del secado de la mezcla de precursores.....	28
Figura 7. Diagrama de flujo para la síntesis de biocompuestos de Hidroxiapatita-Wollastonita .30	
Figura 8. Analizador Simultaneo DSC-TGA.....	31
Figura 9. Diagrama esquemático de un material inmerso en solución SBF.....	37
Figura 10. Análisis termogravimétrico y térmico diferencial para gel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua desde la temperatura ambiente hasta 1000 °c con una velocidad de calentamiento de 10 °c / min.....	45
Figura 11. Análisis termogravimétrico y térmico diferencial la Wollastonita natural desde la temperatura ambiente hasta 1000 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C / min.	46
Figura 12. Patrones de difracción de rayos-x del gel seco obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua tratado térmicamente hasta 350°C y 750°C. (*) Hidroxiapatita.....	47
Figura 13. Espectros FT-IR: (a) Wollastonita natural, (b) para del gel seco a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua tratado térmicamente hasta 750°C.....	48
Figura 14. Patrones de difracción de rayos-X de los biomateriales 100%H, 80%H-20%W, 50%H-50%W, 20%H-80%W y 100%W, tratados térmicamente hasta 750°C.....	49
Figura 15. Imágenes en el Microscopio Electrónico de Transmisión de los polvos: hidroxiapatita (100 H) y Wollastonita (100 W), y los biocompuestos de Hidroxiapatita Wollastonita (80H - 20W, 50H - 50W, 20H - 80W).....	50
Figura 16. Micrografías electrónicas de barrido de los materiales base: Hidroxiapatita (100 H) y Wollastonita natural (100 W) sinterizado a 1200°C durante 5 h, a diferentes magnitudes..	52

Figura 17. Micrografías electrónicas de barrido de los biocompósitos sintéticos de Hidroxiapatita-Wollastonita (80H-20W), (50H-50W), (20H-80W) sinterizados a 1200 ° C durante 5 h, a diferentes magnitudes.....53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cerámicos utilizados en aplicaciones biomédicas.....	9
Tabla 2. Propiedades mecánicas de biomateriales cerámicos.....	11
Tabla 3. Propiedades mecánicas típicas de la hidroxiapatita).....	15
Tabla 4. Composición Química de la Wollastonita NYAD® M200, producida por la minera NYCO S.A de C.V.....	21

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis padres: Oliva y Florenciano, por haberme dado la vida, quererme mucho, creer en mí y porque siempre me han apoyado en todo lo que me propongo. Mamá gracias por el apoyo que me has brindado en toda mi vida, Papá gracias por estar siempre a mi lado y sé que desde el cielo me cuidas. Todo esto se lo debo a ustedes.

A mis Hermanos: Lupita, Roberto, José Angel y Noé Alejandro, gracias por su paciencia, gracias por preocuparse por su hermano, pero sobre todo gracias por estar en otro momento importante de mi vida.

A ti Rita Maria Campa por el apoyo incondicional y su paciencia que siempre me ha brindado a lo largo de todo este tiempo, gracias por los consejos que me diste.

A mi amiga Carolina Campa por brindarme su amistad en estos años y por el apoyo incondicional que me siempre me has brindado.

A mi Director de Tesis, Dr. Martín Antonio Encinas Romero, por su apoyo, su paciencia, por darme de su tiempo, sus aportes, sus críticas, sus comentarios y sugerencias a lo largo de este periodo de estudio.

Al Dr. Felipe Francisco Castellón Barraza, por su apoyo, su paciencia y el tiempo que me dedico para la realización de la Sinterización y Caracterización de los biocompuestos. .

A mis sinodales por su apoyo y el tiempo dedicado a la lectura de mi tesis y por haberla aprobado.

Al CONACYT por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de Maestría.

¡Muchas a Gracias!

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

El hueso es el único tejido del organismo, que al ser dañado es capaz de regenerarse por medio de la creación de un tejido exactamente igual al original (1). De esta manera, cuando el hueso presenta lesiones, ya sea por fracturas u otros defectos, se ponen en marcha de inmediato los mecanismos osteoformadores, con la finalidad de restaurar el tejido óseo en el lugar de la lesión. Generalmente, la dinámica del hueso es suficiente para reconstruir los defectos comunes, sin embargo, en las pérdidas mayores se hace necesario recurrir al aporte de sustitutos óseos (biomateriales) para obtener la reparación.

Los biomateriales son sustancias naturales o sintéticas, que son introducidas en el organismo de manera temporal o permanente, para reparar lesiones en los tejidos del organismo.

Actualmente, existen numerosos estudios e investigaciones acerca de nuevas propiedades y posibles aplicaciones de materiales con propiedades biocompatibles, es decir, materiales que pueden funcionar en sistemas biológicos (2).

La Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{10}(\text{OH})_2$), es el componente mineral predominante de los huesos de los vertebrados, así como del esmalte dentario (3). Sus aplicaciones clínicas son de gran relevancia, debido a que es el cerámico de fosfato de calcio químicamente más parecido a los cristales de las apatitas biológicas. Por tal razón se han desarrollado diversas metodologías para su preparación, entre las que destacan métodos de precipitación, hidrotermales, reacciones de estado-sólido, proceso sol-gel, entre otras (4).

El proceso sol-gel es uno de los métodos más importantes para la producción de biomateriales, debido a las ventajas que éste presenta, entre ellas el uso de reactivos económicos y fáciles de adquirir, procedimientos con bajas temperaturas y relativa simplicidad entre cada una de las etapas de síntesis (5). Entre las principales desventajas de las técnicas sol-gel para la producción de Hidroxiapatita, se encuentran el alto costo de algunos reactivos precursores de calcio y fósforo, así como las bajas velocidades de hidrólisis de algunos agentes de fosfatos. Sin embargo, estas desventajas representan un campo de investigación, el cual presenta una alternativa para aprovechar las bondades que esta técnica ofrece en la síntesis de fosfatos de calcio en general. Sin embargo, con el desarrollo de diferentes rutas sol-gel, haciendo variaciones en la naturaleza de los reactivos precursores, puede dar lugar el uso temperaturas más bajas, así como de rutas más sencillas para la síntesis de este biomaterial.

Sin embargo, la Hidroxiapatita sintética presenta propiedades mecánicas pobres, es quebradiza y relativamente débil comparada con los implantes tradicionales, de tal forma que su uso en zonas de carga, se ha destinado sólo a recubrir otros materiales con propiedades mecánicas resistentes (6). Actualmente se estudian diferentes minerales que proporcionen a la Hidroxiapatita, una fase de refuerzo que aumenten sus propiedades mecánicas sin afectar sus propiedades biológicas (5, 7).

Una solución para resolver este problema, es combinarla con una fase de refuerzo adecuada, produciendo un compósito que ofrezca propiedades mecánicas óptimas, superando con ello limitaciones mecánicas. El biocompósito ideal deberá ser aquel cuyas propiedades biológicas y mecánicas, se conjuguen para ofrecer una adecuada compatibilidad con los tejidos duros del organismo.

La Wollastonita es un silicato de calcio con fórmula molecular CaSiO_3 , la cual ha sido utilizada como biomaterial en huesos artificiales y raíces dentales debido a su buena bioactividad y biocompatibilidad. También se ha utilizado como fase de refuerzo para fabricar biocompósitos con propiedades mecánicas más eficientes. Gracias a las características que presenta la Wollastonita, tiene grandes aplicaciones como biomaterial individual, en fase de refuerzo o como recubrimiento de otros mismos (5,7).

Por otro lado, la Wollastonita natural representa un mineral de gran importancia regional en el Estado de Sonora, ya que en Hermosillo, la Compañía Minera NYCO S. A de C. V., realiza operaciones en el depósito “Pilares”, produciendo Wollastonita de alta pureza, la cual podría ser utilizada directamente como biomaterial en diversas aplicaciones clínicas. Asimismo, el uso de materiales naturales en lugar de materiales sintéticos reduce el costo de producción de los implantes. Además, a diferencia de los materiales sintéticos, la Wollastonita natural tiene una forma acicular característica con relaciones longitud/diámetro entre 15-20 o más, lo cual presumiblemente facilita la producción de una malla entretejida de fibras de Wollastonita proporcionando el refuerzo en el biocompuesto.

Por otro lado, estudios recientes han demostrado que la Wollastonita, además de mejorar las propiedades mecánicas de los materiales, también influye directamente en la propiedades bioactivas de los mismos, generando capas de “apatita neoformada” más gruesas y densas (7), con lo cual se lograrán contactos más directas entre estos materiales de implante y los tejidos vivos del organismo, así como eventualmente uniones más directas, producto de la osteoconducción, dando lugar a la formación de tejido óseo, mediante la actividad celular.

Por tal razón, este trabajo de investigación pretende sintetizar Hidroxiapatita mediante la técnica sol-gel, utilizando nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) y fosfato de amonio ($(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$), y así mismo producir compósitos de Hidroxiapatita-Wollastonita, con diferente porcentaje en peso de Wollastonita natural de alta pureza, utilizada como fase de refuerzo, para incrementar las propiedades mecánicas y bioactivas de la Hidroxiapatita. Para finalmente, proponer un material o serie de biomateriales compuestos alternativos, completamente caracterizados desde el punto de vista estructural y biológico, para su utilización en la reparación de los tejidos duros del organismo.

1.2 Objetivo General

El objetivo general de este trabajo comprende la síntesis, caracterización y evaluación de las propiedades biológicas, de biocompósitos de Hidroxiapatita-Wollastonita, preparados mediante la técnica sol-gel.

1.3 Objetivos Específicos

Para lograr tal objetivo se plantean los siguientes objetivos particulares.

1. Producir Hidroxiapatita mediante la técnica sol-gel utilizando como agentes precursores, Nitrato de Calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) y Fosfato de Amonio ($(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$).
2. Caracterizar estructuralmente el producto de Hidroxiapatita.
3. Producir una serie de biocompósitos de Hidroxiapatita-Wollastonita, mediante la técnica sol-gel con diferente porcentaje en peso de Wollastonita natural de alta pureza.
4. Caracterizar los biocompósitos estructuralmente.
5. Evaluar las propiedades biológicas de los biocompósitos *in vitro*:
 - Bioactividad.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Reconstruir partes dañadas del ser humano ya es una realidad. Más de cincuenta millones de personas en todo el mundo tienen implantado algún tipo de prótesis y es un hecho bien conocido en nuestra sociedad la utilidad y necesidad de todo tipo de implantes, siendo raro que en nuestro entorno no conozcamos algún caso de familiar o amigo que los necesite.

Los materiales que se emplean para la fabricación de implantes son de naturaleza diversa; pueden elaborarse con tejidos de los mismos pacientes (autoinjerto), con tejidos de algún donante humano (homoinjerto) o de otras especies (heteroinjerto), así como a partir de materiales hechos por el propio hombre (aloinjertos); a estos últimos se les conoce como biomateriales, y pueden ser de origen sintético o natural (pero modificados por el hombre). Estos se utilizan en la fabricación de dispositivos médicos capaces de desempeñar diferentes funciones en el organismo humano.

Los biomateriales están destinados a su aplicación en seres vivos, y para su fabricación se requiere la coordinación de expertos de muy diversos campos. El campo de los biomateriales ha experimentado un espectacular avance en los últimos años y una motivación importante, para ello ha sido el hecho de que la esperanza de vida aumente de forma considerable (23).

Los biomateriales deben cumplir con las condiciones de ser biocompatibles y asegurar una determinada vida media. A su vez, tienen que aportar las prestaciones específicas que requiera la aplicación a que vayan destinados. Hoy en día muchos biomateriales son diseñados, sintetizados y procesados con el único fin de tener una aplicación en el campo médico (24). La ciencia y la tecnología de biomateriales constituyen un campo con retos serios que exigen una intensa actividad de investigación, desarrollo y aplicación de numerosas disciplinas e ingenierías (25).

El fosfato de calcio más utilizado en la fabricación de implantes es la Hidroxiapatita, por ser el compuesto más parecido al componente mineral de los huesos, presenta buenas propiedades como biomaterial, tales como biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad y unión directa al hueso. Desde los años 90 hasta hoy en la actualidad, se realizan innumerables investigaciones para obtener un sistema que combine las ventajas mecánicas de los metales y la afinidad biológica de la Hidroxiapatita obtenida por diferentes métodos de síntesis, donde destaca el método sol-gel (26).

2.1 Biomateriales.

Los biomateriales son materiales farmacológicamente inertes compuestos de unidades o bloques de materiales derivados de sustancias biológicamente naturales, utilizados para reemplazamientos directos de tejidos o para ingeniería y modificación de cualquier tejido, órgano o función de un cuerpo.

Generalmente se requiere un injerto o un sustituto de hueso para ayudar o completar la reparación de una deficiencia esquelética debida a trauma, tumores o desarrollo anormal, y así restaurar la función normal del tejido. Un Biomaterial no es más que una sustancia o una combinación de sustancias que puede ser usada por un período de tiempo como un todo o formando parte de un sistema que trata, aumenta o sustituye un tejido, órgano o función del cuerpo. Es decir, un material no vivo usado como dispositivo médico dirigido a interactuar con el sistema biológico (8).

Algunos biomateriales contienen drogas y son considerados medicamentos, otros pueden incluir células vivas y construir los llamados biomateriales híbridos (9). También hay biomateriales que incluyen compuestos capaces de responder a señales provenientes del medio biológico, estos reciben el nombre de materiales inteligentes.

Para el desarrollo de nuevos biomateriales deben tenerse en cuenta algunos factores como:

- Ser biocompatible, es decir, debe ser aceptado por el organismo, no provocar que éste desarrolle sistemas de rechazo ante la presencia del biomaterial

- Tener un tiempo de fatiga adecuado. Ser capaz de soportar cargas cuando sea necesario. Esto permite el mantenimiento de la estructura de tal forma, que el hueso formado pueda remodelarse adquiriendo cualidades que el hueso original.
- Ser químicamente estable (no presentar degradación en el tiempo) e inerte.
- Ser osteoactivo, es decir, debe estimular la formación de nuevo hueso. La osteoactividad se manifiesta en el carácter osteoinductor y/o osteoconductor del implante. Alternativamente un material puede estimular la sustitución por pasos, es decir, al mismo tiempo que se reabsorbe se produce un nuevo hueso en su lugar.
- El implante no debe causar molestias o dolor, refractura, sangramiento excesivo, respuesta a cuerpo extraño, deformidad o transmisión de enfermedades. No debe reabsorberse antes de la formación de hueso nuevo, ya que puede provocar formación de cavidades y/o formación de tensiones.
- No ser tóxico, ni carcinógeno.

Por biocompatibilidad se entiende la capacidad del biomaterial o dispositivo médico implantable para ser tolerado por el organismo o aceptado por el medio biológico que lo va a rodear, una vez implantado. Pero además, cualquier diseño debe presentar buenas características funcionales, pues debe ofrecer la suficiente estabilidad e integridad para mantener unas condiciones óptimas del proceso curativo. La biodegradación considera la descomposición del material, con rotura de los enlaces y su destrucción o modificación, en un medio tan agresivo como lo es el organismo humano.

2.1.1 Clasificación de los Biomateriales.

Existen cuatro grandes grupos de materiales sintéticos usados para implantación: metálicos, cerámicos, poliméricos y compuestos de ellos (10).

1. Biomateriales metálicos.

Los metales se utilizan como biomateriales debido a su excelente conductividad eléctrica, térmica y a sus propiedades mecánicas.

Algunos metales se utilizan como sustitutos pasivos para el remplazo de tejidos duros como es el caso de la cadera y las articulaciones presentes en las rodillas, para la consolidación y reparación de alguna fractura, como las placas óseas y los tornillos de fijación de la columna vertebral, así como implantes dentales, por sus excelentes propiedades mecánicas y resistencia a la corrosión.

La primera aleación metálica desarrollada específicamente para uso humano fue el "acero de vanadio " que se utilizaba para fabricar placas para fracturas óseas (placas Sherman) y tornillos. La mayoría de los metales como el hierro (Fe), el cromo (Cr), cobalto (Co), níquel (Ni), titanio (Ti), tantalio (Ta), niobio (Nb), molibdeno (Mo), y el tungsteno (W), que se utilizan para hacer aleaciones para la fabricación de implantes sólo puede ser tolerado por el cuerpo en cantidades mínimas.

Algunos de los elementos metálicos, en formas naturales, son esenciales en las funciones de los glóbulos rojos (Fe) o la síntesis de la vitamina B12 (Co), pero no pueden ser tolerados en grandes cantidades en el cuerpo. La biocompatibilidad del implante metálico es de gran preocupación debido a que estos implantes se pueden corroer en un medio ambiente in vivo (11).

2. Biomateriales cerámicos y cristalinos

Los cerámicos se utilizan como componentes de implantes de cadera, implantes dentales, implantes de oído medio, y válvulas del corazón. Sin embargo, estos biomateriales se han utilizado extensamente menos que cualquiera de los metales o polímeros. Algunos cerámicos que han sido utilizados para aplicaciones biomédicas se enlistan en la Tabla 1 (12).

Tabla 1. Cerámicos utilizados en aplicaciones biomédicas

Cerámico	Formula Química	Comentario
Alúmina	Al_2O_3	Bioinerte
Zirconia	ZrO_2	
Carbón Pirolític		
Bioglass	$Na_2OCaOP_2O_3SiO$	Bioactivo
Hidroxiapatita (sinterizada a altas temperaturas)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	
Hidroxiapatita (sinterizada a bajas temperaturas)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	Biodegradable
Fosfato tricálcico	$Ca_3(PO_4)_2$	

Las propiedades biológicas de los biomateriales, relacionadas con su interacción con el medio fisiológico que los rodea, se pueden clasificar en:

Bioinertes: se refiere a un material que conserva su estructura en el cuerpo después de la implantación y no induce ninguna reacción inmunológica en el huésped.

Bioactivos: se refiere a materiales que forman enlaces con los tejidos vivos.

Biodegradables: se refiere a materiales que se degradan (por descomposición hidrolítica) en el cuerpo mientras están siendo reemplazados por regeneración de tejido natural, los subproductos químicos de los materiales de degradación son absorbidos y se liberan a través de los procesos metabólicos del cuerpo (12).

Las propiedades deseables en un biocerámico son (11):

- No ser tóxico.
- No ser cancerígeno.
- No ser alérgico.
- No ser inflamatorio.
- Debe ser biocompatible.
- Debe ser biofuncional durante toda su vida en el huésped.

Estructura y propiedades de los biomateriales cerámicos.

Los cerámicos son materiales compuestos de elementos metálicos y no metálicos unidos por enlaces iónicos y / o covalentes. Al igual que los metales, los enlaces interatómicos en los cerámicos crean estructuras cristalinas en tercera dimensión y de largo alcance. Los electrones en los enlaces iónicos y covalentes están localizados entre los iones constituyentes o átomos. En consecuencia, los cerámicos son típicamente aislantes eléctricos y térmicos. Los fuertes lazos iónicos y covalentes también hacen a los cerámicos duros y quebradizos, debido a que los planos de la red cristalina que forman los átomos no pueden deslizarse unas sobre otras. Por otra parte, los cerámicos son sensibles a la presencia de grietas u otros defectos. La naturaleza iónica y / o covalente de los cerámicos también influye en su comportamiento químico (12).

Degradación de los biomateriales cerámicos.

A pesar de que no se someten a la corrosión, los cerámicos son susceptibles a otras formas de degradación cuando se exponen al medio ambiente fisiológico. El mecanismo y la velocidad de degradación dependen del tipo particular del cerámico. Por ejemplo la alúmina, que se considera un cerámico bioinerte, experimenta una disminución en su resistencia dependiendo del tiempo que permanece inmersa en una solución salina in vitro y después de la implantación, proceso que puede deberse a una disolución preferencial de impurezas que resulta en la propagación de grietas. Otro ejemplo son los fosfatos de calcio que debido a su similitud con los componentes minerales de los huesos, son reabsorbidos por los osteoclastos (células que descomponen los huesos) (12).

Propiedades mecánicas de los biomateriales cerámicos.

Los principales inconvenientes para utilizar los cerámicos como implantes son su fragilidad y su baja propiedad de resistencia a la tracción. En la Tabla 2 se muestran las propiedades mecánicas de algunos biomateriales. A pesar de que pueden tener una resistencia excepcional cuando son sometidos a compresión, los cerámicos fallan a magnitudes bajas de tensión al ser sometidos a tracción o flexión. Las propiedades mecánicas de los fosfatos de calcio los hacen inadecuados como implantes de carga. Clínicamente, la Hidroxiapatita se ha usado como un relleno de defectos óseos y como implante en sitios anatómicos libres de carga (por ejemplo, el hueso del tabique nasal y el oído medio). Además, la Hidroxiapatita se ha usado como revestimiento sobre biomateriales ortopédicos metálicos, así como implantes dentales para promover su fijación en el hueso. En estos casos, el metal subyacente lleva la carga, mientras que los lazos que rodean al hueso son fuertemente ligados por la Hidroxiapatita (12).

Tabla 2. Propiedades mecánicas de biomateriales cerámicos.

	Módulo de Young E (GPa)	Resistencia a la compresión σ_{UCS} (MPa)	Resistencia a la tracción σ_{UCS} (MPa)
Alúmina	380	4500	350
Bioglass-cerámicos	22	500	56-83
Fosfatos de Calcio	40-117	510-896	69-193
Carbón Pírolítico	18-28	517	250-560

3. Biomateriales poliméricos

Los polímeros son los materiales más utilizados en aplicaciones biomédicas. Estos son los materiales de elección para los dispositivos cardiovasculares, así como para la sustitución y el aumento de diversos tejidos blandos. Los polímeros también se utilizan en sistemas de suministro de fármacos, en el diagnóstico del

SIDA, y como un material de andamiaje para aplicaciones de ingeniería de tejidos.

Algunos ejemplos de aplicaciones actuales incluyen los injertos vasculares, válvulas cardíacas, corazones artificiales, implantes mamarios, lentes de contacto, lentes intraoculares, los componentes de oxigenadores extracorpóreos, dializadores y las unidades de plasmaféresis, revestimientos para tabletas y cápsulas farmacéuticas, suturas, adhesivos, y los sustitutos de sangre (12).

4. Biomateriales compuestos

Los materiales compuestos son sólidos que contienen dos o más materiales constituyentes o fases distintas, en una escala mayor que la atómica. El término

"compuesto" generalmente se reserva para aquellos materiales en los que las distintas fases se separan en una escala mayor que la atómica, y en el que las propiedades tales como el módulo elástico se modifican significativamente en comparación con las de un material homogéneo. En consecuencia, los plásticos reforzados con fibra de vidrio, así como materiales naturales tales como los huesos son vistos como materiales compuestos, pero las aleaciones como el latón no lo son.

Los materiales compuestos ofrecen una variedad de ventajas en comparación con los materiales homogéneos. Estos incluyen la habilidad para el científico o ingeniero de ejercer un control considerable sobre las propiedades del material.

Tienen el potencial para ser rígidos, fuertes y ligeros, así como para ser altamente resistentes y compatibles. En biomateriales, es importante que cada componente del material compuesto sea biocompatible. Además, la interfaz entre los constituyentes no debe ser degradada por el entorno del cuerpo. Algunas aplicaciones de los materiales compuestos como biomateriales son: (1) compuestos para rellenos dentales, (2) metil-metacrilato reforzado con cemento óseo y polietileno de ultra alto peso molecular, utilizados en la cabeza femoral, (3) implantes ortopédicos con las superficies porosas (11).

- Tener un diseño de ingeniería perfecto; esto es, el tamaño y la forma del implante deben ser los adecuados.
- Ser relativamente barato, reproducible y fácil de fabricar y procesar para su producción en gran escala.

2.2 Hidroxiapatita.

El término apatita fue aplicado por primera vez a minerales en 1788 por Werner, actualmente se refiere a una familia de cristales que corresponden a la fórmula $M_{10}(RO_4)_6X_2$, donde M es habitualmente calcio, R fósforo y X un hidróxido o un compuesto halogenado como fluorina. Con el desarrollo de la difracción de rayos X se confirmó, en 1926, que la fase inorgánica del hueso era una apatita (27).

La Hidroxiapatita es una apatita compuesta esencialmente por fósforo y calcio. Su fórmula corresponde a $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, con una relación de calcio fósforo de 1.67. La Hidroxiapatita es el principal componente inorgánico del hueso de los vertebrados; también la encontramos en la dentina y el esmalte dental (13).

El fosfato de calcio más utilizado en la fabricación de implantes es la Hidroxiapatita, por ser el compuesto más parecido al componente mineral de los huesos, presenta buenas propiedades como biomaterial, tales como biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad y unión directa al hueso. La Hidroxiapatita no es conveniente para usar en partes que soporten peso. Por eso, la Hidroxiapatita es ideal para usar como un recubrimiento de implantes metálicos.

Este fosfato de calcio, que se puede obtener de forma sintética, presenta características de biocompatibilidad, no toxicidad, estabilidad química, osteoconducción y bioactividad; tales propiedades hacen al material muy práctico para usos médicos. La Hidroxiapatita se puede usar como reemplazo de partes pequeñas de hueso, relleno de cavidades en odontología, recubrimiento de superficies de metales para implantes, refuerzo en materiales compuestos y como liberador de medicamentos, entre otros. Para una aplicación determinada se requieren diferentes características de la Hidroxiapatita, como pueden ser su capacidad de reabsorción o bioactividad (14).

La Hidroxiapatita sintética, es un fosfato de calcio con la composición química más parecida al componente mineral de los huesos, presenta buenas propiedades como biomaterial, destacándose la biocompatibilidad con los tejidos vivos. La Hidroxiapatita sintética de origen cerámico está constituida por partículas esféricas de alta densidad y pureza. Se considera una cerámica ya que se obtiene por los calentamientos de fosfatos de calcio amorfos obtenidos. El

medio utilizado y las temperaturas aplicadas, consideran la estructura cristalina, la porosidad y la solubilidad del producto resultante.

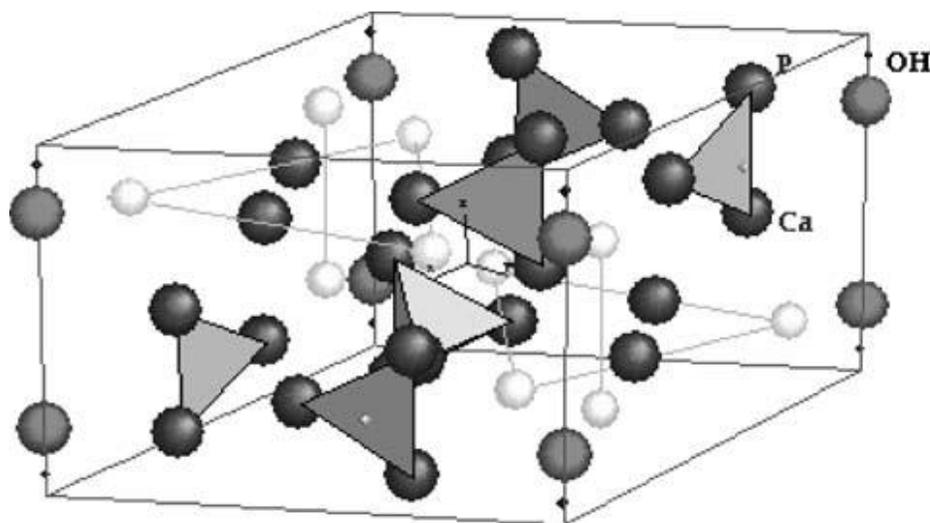


Figura 1. Estructura de la Hidroxiapatita $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$. Departamento de Química, Universidad del Estado de Moscú (15).

Las cerámicas de fosfato de calcio o bioactivas, como la Hidroxiapatita, han demostrado en estudios realizados a lo largo de las 3 últimas décadas, ser biocompatibles, no tóxicas y capaces de unirse al hueso, permitiendo una verdadera osteointegración.

A pesar de que la Hidroxiapatita sintética presenta buenas propiedades mecánicas estáticas, una vez impuestas en condiciones fisiológicas su resistencia a la fatiga es baja. Por tanto la mayor parte de la Hidroxiapatita sintética no es apta para aplicaciones que precisen carga mecánica. Se utiliza exitosamente como sustituto de injerto óseo para rellenar defectos metafisiarios y como recubrimientos de sustratos de otros materiales con mejores propiedades mecánicas. Actualmente se estudian diferentes minerales que proporcionen a la Hidroxiapatita una fase de refuerzo que aumenten sus propiedades mecánicas sin afectar sus propiedades biológicas. (16)

Tabla 3. Propiedades mecánicas típicas de la Hidroxiapatita. (18)

Propiedad	Característica
Densidad Teórica	3.156 g/ml
Dureza	5 mohs
Esfuerzo de Tensión	40 - 100 MPa
Esfuerzo de Flexión	20 - 80 MPa
Esfuerzo de Compresión	100 - 900 MPa
Fractura	Aprox. 1 MPa m ^{0.5}
Módulo de Young	70 – 120 GPa

2.3 Wollastonita.

La Wollastonita es silicato de calcio que se encuentra en forma natural con fórmula molecular CaSiO_3 , tiene una composición en peso teórica de 48.3% de óxido de calcio (CaO) y 51.7% de dióxido de silicio (SiO_2).

Aunque la Wollastonita es en su mayoría pura, también puede contener algo de fierro, magnesio, manganeso, aluminio, potasio, sodio, o estroncio sustituyendo al calcio en la estructura del mineral. La Wollastonita pura presenta un blanco brillante (Figura 2), dependiendo del tipo y la cantidad de impurezas aparece de color gris, café o diferentes tonalidades de rojo (17).



Figura 2.- Wollastonita natural.

La Wollastonita presenta las propiedades físicas siguientes:

- Fórmula: CaSiO_3 - $\text{Ca}_3 [\text{Si}_3\text{O}_9]$
- Densidad: 2.8 – 3.1 g/mL
- Punto de fusión: 1,540°C
- Dureza según la escala de Mohs: 4.5 – 5.0
- Sistema cristalino: triclinico
- Color: blanco a grisáceo traslúcido
- Color de raya en placa de porcelana: blanca
- pH: 8.0 – 9.0

La Wollastonita presenta forma acicular, (forma de agujas), misma que le permite ser utilizada como un componente de refuerzo para otros materiales. La Figura 3 muestra la morfología acicular típica de la Wollastonita, la cual confiere mayor eficiencia mecánica en los materiales compuestos donde se encuentra presente.

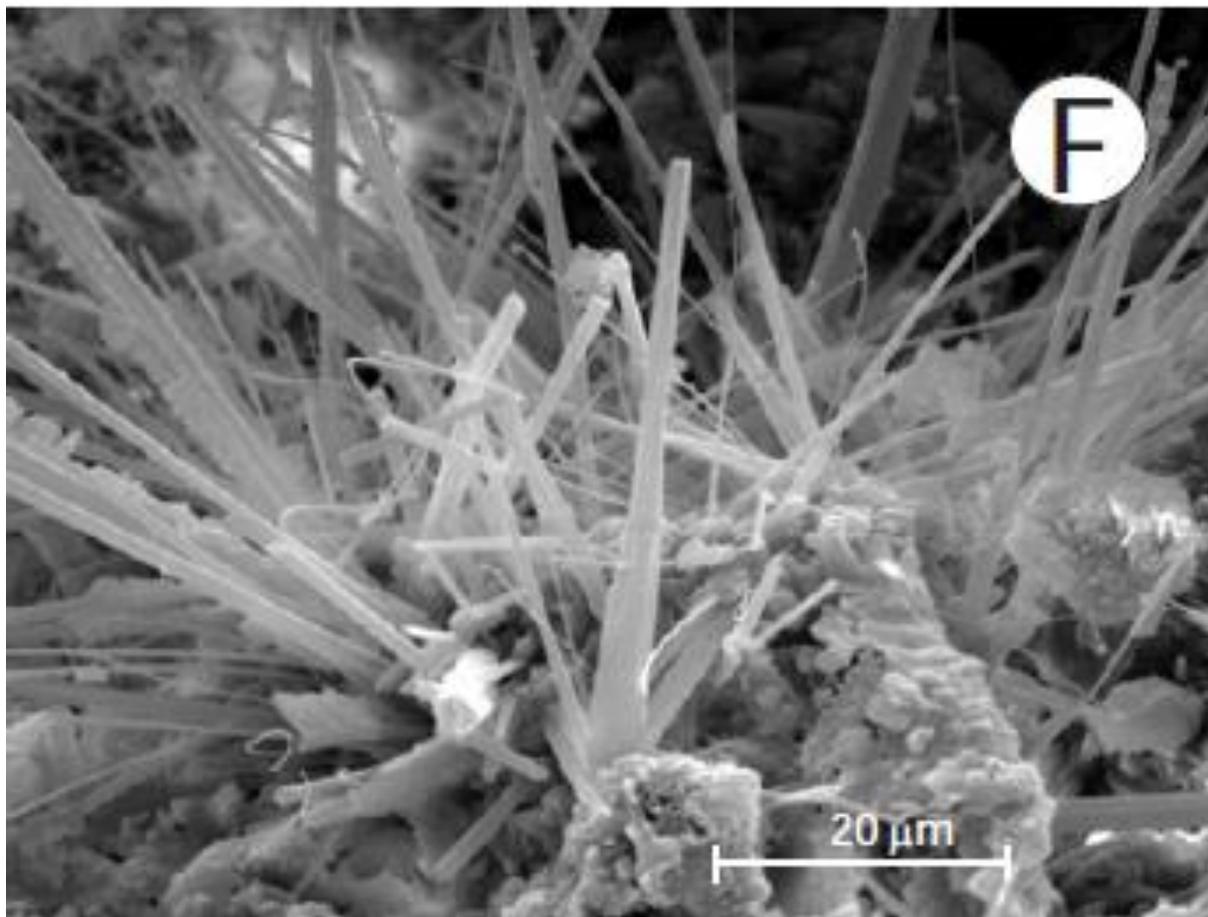


Figura 3.- Morfología acicular típica de la Wollastonita (17).

En la Wollastonita, los iones de calcio se encuentran en un entorno octaédrico rodeados de 6 átomos de oxígeno (Figura 4). En la naturaleza pueden encontrarse otros iones que sustituyen al calcio como el hierro y el manganeso formando ferrowollastonita y manganowollastonita respectivamente (18).

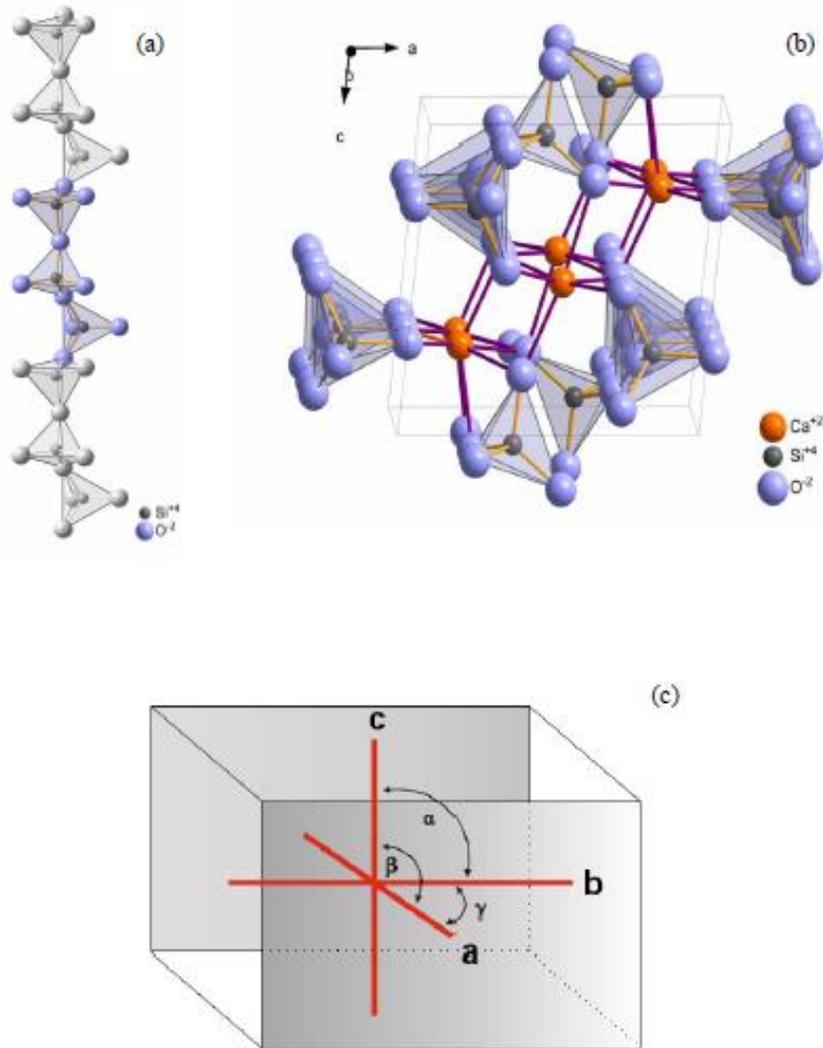


Figura 4. Estructura de la Wollastonita, CaSiO_3 : (a) Cadena de SiO_4 , (b) Estructura cristalina, (c) Ejes cristalográficos de una estructura triclinica.

Respecto a su geología económica, México es uno de los principales países productores a nivel mundial, conjuntamente con EUA, India, Finlandia y China. Prácticamente, la totalidad de la producción nacional se destina a la exportación. Los principales yacimientos se encuentran en el estado de Sonora (Hermosillo, NYCO-Minerals), Zacatecas (Pánfilo Natera) e Hidalgo (Villa Juárez), siendo el depósito de Hermosillo de gran escala y los de Pánfilo Natera y Villa Juárez, de pequeña y mediana producción (18).

La reacción metamórfica entre sílice y carbonato de calcio para formar Wollastonita ocurre aproximadamente a 450-600°C y profundidades cercanas a la superficie (17). La reacción química a través del contacto metamórfico de silica y caliza ocurre según la reacción siguiente:



La Wollastonita es un mineral polimorfo, es decir, posee diferentes estructuras físicas bajo la misma composición química CaSiO_3 . Los dos polimorfismos más conocidos son: Wollastonita formada a baja temperatura, (β -Wollastonita) y pseudo Wollastonita formada a alta temperatura, (α -Wollastonita). Existen dos formas estrechamente relacionadas del polimorfismo a baja temperatura, las cuales son: Wollastonita en sí, que posee una estructura cristalográfica triclinica (Wollastonita-1T) y la que posee una estructura cristalográfica monoclinica conocida como parawollastonita o Wollastonita-2M.

Desde la década de los 90, la Wollastonita ha sido considerada objeto de estudio como material artificial para implante en huesos y piezas dentales, debido a que este material exhibe buenas características de biocompatibilidad y bioactividad, tanto en estudios “in vitro” como en estudios “in vivo”. Varios investigadores han reportado una rápida formación de una capa de apatita sobre la superficie de la Wollastonita, comparada con las capas obtenidas sobre otros materiales cerámicos como biovidrios y vitrocerámicos cuando están inmersos en fluidos fisiológicos simulados (SBF). Por otro lado, numerosos estudios toxicológicos han demostrado que la Wollastonita es un material totalmente biocompatible, por lo cual se considera que no presenta propiedades adversas para la salud (18)

2.4 Fluido fisiológico simulado (SBF).

Una de las principales características de los materiales bioactivos es la habilidad para formar capas de apatita sobre su superficie cuando se ponen en contacto con fluidos fisiológicos *in vivo* o con fluidos fisiológicos simulados (SBF) *in vitro*. Estas capas están asociadas con la bioreactividad, y se ha comprobado que son responsables de los enlaces de cerámicos bioactivos con el hueso huésped.

En años recientes los estudios *in vitro* de bioactividad de nuevos materiales candidatos para implantación se han incrementado considerablemente. En los primeros estudios *in vitro* de bioactividad de biovidrios, desarrollados por Hench y colaboradores en una solución búfer de tris (hidroximetil) aminometano con HCl a un pH de 7.25 (tris búfer) a 37°C se encontró que ocurre una liberación de iones calcio y fósforo hacia la solución, así como una modificación del pH y crecimiento de una capa de apatita sobre la superficie del biovidrio. En 1990 Kokubo y colaboradores propusieron una solución fisiológica simulada SBF, la cual es una solución sin células, con un pH y una concentración iónica similar al plasma sanguíneo humano. La solución SBF contiene iones Ca^{2+} y HPO_4^{2-} , lo cual le permite ser usada para estudiar la bioactividad *in vitro* una gran variedad de materiales. En este tipo de estudios *in vitro*, cuando los materiales bioactivos se ponen en contacto con esta solución, ocurren tres fenómenos: i) liberación de iones, ii) modificación del pH y iii) crecimiento de una capa de apatita sobre la superficie del material (20).

Los investigadores TadashiKokubo y Larry Hench, en trabajos independientes, confirmaron la formación de apatita sobre la superficie del biovidrio 45S5 en al ponerse en contacto con la solución SBF. El análisis por las técnicas de difracción de rayos-X de película delgada (TF-XRD), espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR), microscopio electrónico de barrido y microscopio electrónico de transmisión, de la capa de apatita neoformada, mostró que ésta era similar al componente inorgánico de los huesos, tanto en estructura como en composición. Con base en estos resultados, posteriormente se estableció que los osteoblastos presentaban preferencialmente la capacidad de proliferar, para producir colágeno y apatita y consecuentemente formar un fuerte enlace químico entre el material de implante y el hueso vivo a través de esta capa de apatita (21).

2.4.1 Diseño de la Solución de Fluido Fisiológico Simulado (SBF).

En 1991 TadashiKokubo, propuso que la bioactividad “in vivo” de un material puede predecirse mediante el análisis de su habilidad para formar una capa de Hidroxiapatita carbonatada sobre su superficie, al ponerse en contacto con una solución SBF. Asimismo, propuso la composición y concentraciones de los diferentes iones en esta solución, la cual se presenta en la Tabla 4, comparada con la composición del plasma sanguíneo humano.

Tabla 4. Concentración del fluido fisiológico simulado (SBF) propuesto por Kokubo, comparada con el plasma sanguíneo humano.

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

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

Es preciso mencionar, que la composición de la solución SBF mostrada en la Tabla 4, es una formulación corregida por el mismo Kokubo, conocida como “corrected SBF (c-SBF)” ya que la formulación original (original SBF), no consideraba a los iones SO₄²⁺ contenidos en el plasma humano. Sin embargo, esta solución c-SBF se reporta convencionalmente como solución SBF en la mayoría de las investigaciones relacionadas con esta técnica.

Esta formulación ha sido objeto de varias modificaciones, las cuales tratan de corregir las diferencias existentes entre esta solución y el plasma sanguíneo.

Como se observa en la Tabla 4, esta solución corregida comparada con el plasma sanguíneo humano es aún rica en ion Cl⁻ y deficiente en ion HCO₃⁻. En 2003 Oyane y colaboradores, trataron de corregir estas diferencias formulando una solución SBF conocida como “revised SBF (r-SBF)”, en la cual las concentraciones de Cl⁻ y HCO₃⁻ fueron respectivamente disminuida e incrementada, hasta alcanzar los niveles del plasma sanguíneo humano. Sin embargo, como el carbonato de calcio tiene fuerte tendencia a precipitar, no solo se produjeron precipitados de apatita sino también de calcita. En 2004 Takadama y colaboradores, propusieron una nueva modificación en la solución SBF, conocida como “newlyimproved SBF (n-SBF)” en la cual solo disminuyeron la concentración del ion Cl⁻ hasta el nivel del plasma sanguíneo, dejando la concentración del ion HCO₃⁻ igual a la del c-SBF. Esta nueva formulación fue comparada con la formulación convencional propuesta por Kokubo (c-SBF), con respecto a su estabilidad y

reproducibilidad para producir apatita sobre materiales sintéticos, con lo cual se constató que el comportamiento del c-SBF no difiere del n-SBF en estos dos aspectos (18).

En el 2003 se presentó ante el Comité Técnico ISOTC/150 de la Organización Internacional para la Estandarización, la metodología para la preparación de esta formulación convencional para la solución c-SBF, como una solución indicada para la medida “in vitro” de la habilidad de los materiales de implante para formar una capa de apatita sobre su superficie, como una predicción de la bioactividad de estos materiales al momento de ser implantados dentro del organismo (21).

2.4.2 Análisis de Bioactividad en Materiales de Implante.

El ensayo de bioactividad es uno de los análisis que se realiza a los materiales de implante, entre ellos los biocerámicos, el cual consiste en poner a estos materiales en contacto con fluidos fisiológicos simulados, emulando las condiciones del cuerpo humano, con el fin de determinar su comportamiento dentro del organismo y definir la posibilidad de su aplicación como materiales de implante con carácter bioactivo. La bioactividad consiste en una modificación superficial de los materiales, generada por su reacción con los fluidos fisiológicos, dando lugar la formación de una capa neoformada de Hidroxiapatita carbonatada (CHA), un material biológicamente activo, el cual es química y estructuralmente equivalente a la fase mineral del hueso, permitiendo la unión interfacial del implante con el tejido conectivo, logrando eventualmente igualar el comportamiento mecánico del implante con el tejido a reemplazar. Los biocerámicos que presentan esta característica se les denomina Bioactivos (18).

El procedimiento para evaluar la habilidad de los materiales de implante para formar Hidroxiapatita carbonatada sobre sus superficies, al ponerse en contacto con soluciones fisiológicas simuladas, se fundamenta en los aspectos siguientes:

Pruebas de Bioactividad Mediante Inmersión de Materiales en Soluciones SBF.

a) Una vez formulada la solución SBF, se procede a calcular el volumen apropiado de la misma, de acuerdo a las dimensiones del espécimen a evaluar.

Materiales densos.

Para estos materiales, se miden las dimensiones del espécimen y se calcula su área superficial. Seguidamente se calcula el volumen de solución SBF que será usado para el análisis de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$V_s = \frac{S\alpha}{10}$$

Donde V_s es el volumen de la solución SBF en ml y $S\alpha$ es el área del espécimen en mm^2 .

Materiales porosos.

Para materiales con alta porosidad, el volumen de solución SBF utilizado para el análisis, debe ser mayor al calculado con la ecuación descrita anteriormente.

- b) Una vez calculado el volumen adecuado de la solución SBF, este se coloca en un recipiente de plástico. Después de calentar la solución a 37°C , el espécimen se sumerge completamente en ella.
- c) Después de sumergir el espécimen en la solución SBF y mantenerlo a 37°C , el análisis de bioactividad se puede realizar en diferentes intervalos de tiempo dentro de las primeras cuatro semanas. Lo anterior se debe a que los materiales bioactivos, generalmente producen una capa de hidroxiapatita carbonatada sobre sus superficies, dentro de las primeras cuatro semanas de inmersión.
- d) Una vez transcurrido el tiempo de análisis, el espécimen se saca de la solución SBF y se lava con agua deionizada. Seguidamente se seca a temperatura ambiente.
- e) Finalmente se analiza la nueva capa formada sobre la superficie de los materiales, así como también, la carga iónica y el pH de la solución SBF remanente (8).

2.5 Proceso Sol-Gel.

La técnica Sol-Gel es una herramienta experimental utilizada para el desarrollo de nuevos materiales con aplicaciones tecnológicas importantes. Este procedimiento químico consiste en transformar una solución que contiene un ion metálico en una gelatina o un precipitado, mediante reacciones químicas en condiciones sencillas de presión y temperatura ambiente. (18)

Este procedimiento consiste de cuatro etapas:

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

Esta técnica nos permite formar materiales puros con la ventaja de ser una ruta económica y relativamente sencilla de llevar a cabo.

Un sol es una suspensión coloidal de partículas sólidas en una fase líquida, donde las partículas dispersas son lo suficiente pequeñas para permanecer suspendidas por el movimiento Browniano. Un gel es una red de material sólido conteniendo un componente líquido, ambos componentes se encuentran en estado altamente disperso.

Preparación del Sol.

Un sol es una suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido, existen dos vías básicas para obtener los soles: los sistemas acuosos y los sistemas orgánicos. En los sistemas acuosos se utilizan como precursores óxidos, hidróxidos y sales tanto orgánicas como inorgánicas, estos compuestos se dispersan o se disuelven en agua. Los sistemas orgánicos se obtienen a partir de compuestos metal-orgánicos (principalmente alcóxidos) disueltos en un solvente orgánico, que generalmente es un alcohol. Durante esta etapa se desarrollan reacciones de “hidrólisis” de los alcóxidos metálicos con el agua, formándose hidróxidos metálicos. Asimismo, los hidróxidos metálicos se combinan para producir óxidos metálicos,

liberando además una molécula de agua o de alcohol, razón por la cual, esta segunda reacción recibe el nombre de “condensación”.

Gelificación.

Una vez realizadas las reacciones de hidrólisis y condensación del proceso anterior, prosigue la formación de agregados, los cuales se enlazan hasta formar un único agregado gigante denominado gel. En el momento de formación del gel hay muchos agregados en el sol que se unen entre sí para formar una red sólida, lo cual le da la elasticidad al gel mientras ocurre un cambio abrupto de la viscosidad.

Envejecimiento.

Luego de la gelificación el sistema continúa reaccionando, dando lugar a reacciones de “polimerización”, donde aumenta la densidad y la resistencia mecánica del sólido. Ocurren también otras reacciones como sinéresis, maduración y cambios de fase.

Secado y Tratamiento Térmico.

La fase líquida constituye la mayor parte del volumen del gel húmedo. El secado de esta fase líquida ocurre mediante evaporación, la cual causa una contracción acompañada de endurecimiento del gel, estos geles secos también reciben el nombre de “xerogeles”.

Durante el tratamiento térmico ocurren una serie de cambios físicos y químicos en los materiales, los cuales pueden llevar a la transformación de fases existentes y la aparición de nuevos compuestos. Estos cambios pueden ser analizados mediante técnicas como el análisis termogravimétrico y dilatometría entre otras.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Síntesis y caracterización de biocompósitos de Hidroxiapatita-Wollastonita

Procedimiento experimental.

Los biocompósitos de Hidroxiapatita-Wollastonita se prepararan mediante la técnica sol-gel utilizando nitrato de calcio, fosfato de amonio y Wollastonita natural de alta pureza (98.25%) como fase de refuerzo. La cantidad de los agentes precursores se fijara de tal forma que se obtenga la relación molar Ca/P igual a 1.67, las cantidades de Wollastonita se fijaran de tal forma que se obtengan porcentajes en peso de 0, 20, 50, 80 y 100% de este material en los biocompósitos.

La síntesis de los biocompósitos de Hidroxiapatita-Wollastonita se desarrollara mediante las siguientes etapas: i) para producir aproximadamente 1.0 gr de Hidroxiapatita pura, se disolverán 0.1639 moles de nitrato de calcio en 5 ml de agua deionizada, mediante agitación ultrasónica, esto durante un lapso de 15 minutos, después de que se haya mezclado totalmente, se agregaran 0.0979 moles de fosfato de amonio y nuevamente mediante ultrasónico, por un tiempo de 30 minutos; para obtener una relación molar Ca/P igual a 1.67. ii) La mezcla de precursores se colocara en un equipo con agitación magnética, por un lapso de 2 horas a temperatura ambiente, en este tiempo se iniciara a controlar el pH, el cual debe de estar en los rangos de 6 a 7 con amoniaco líquido. iii) Los geles se secan a 120°C por un lapso de 12 horas. iv) Una vez obtenido el gel seco, la mezcla se someterá a tratamiento

térmico hasta 700°C, primeramente a una temperatura de 350°C y después hasta 700°C.



Figura 5. Proceso de agitación ultrasónica.

Para producir los biocompuestos de Hidroxiapatita-Wollastonita, primeramente se suspendió la cantidad adecuada de Wollastonita para obtener materiales con porcentajes en peso de 20% (0.25 g), 50% (1 g) y 80% (4 g) en el volumen apropiado de agua para mantener una relación sólido-líquido constante de 1:2.25 (w/v) en todos los experimentos. Posteriormente se continuó con cada una de las etapas descritas anteriormente, hasta obtener la mezcla de geles secos con la proporción adecuada de Wollastonita natural.

Los geles secos fueron molidos en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino y posteriormente tratados térmicamente hasta 750°C, en un horno de alta temperatura Thermolyne 46100 (Thermolyne, Babuque, IA) en aire. La temperatura se elevó a razón de 10°C/min hasta llegar a la temperatura de 750°C, manteniéndose a esta condición durante 5 h. Seguidamente, los materiales se sacaron del horno permitiendo un enfriamiento súbito al medio ambiente.



Figura 6. Imagen del procedimiento del secado de la mezcla de precursores.

Los biocompuestos de Hidroxiapatita-Wollastonita fueron caracterizados por las técnicas de difracción de rayos-X (XRD, por sus siglas en inglés), espectroscopia infrarroja de transformadas de Fourier (FT-IR), espectroscopia de dispersión de energía (EDS), microscopía electrónica de barrido (SEM), y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

El diagrama de flujo del proceso integral de síntesis y caracterización de los biocompuestos de Hidroxiapatita-Wollastonita aparece en la Figura 7.

Tabla 4. Composición Química de la Wollastonita NYAD® M200, producida por la minera NYCO S.A de C.V.

Composición Química	CaSiO₃
Componente	Valor Típico (%)
CaO	46.25
SiO ₂	52
Fe ₂ O ₃	0.25
Al ₂ O ₃	0.40
MnO	0.025
MgO	0.50
TiO ₂	0.025
K ₂ O	0.15
%wt. Pérdidas (1000°C)	0.40

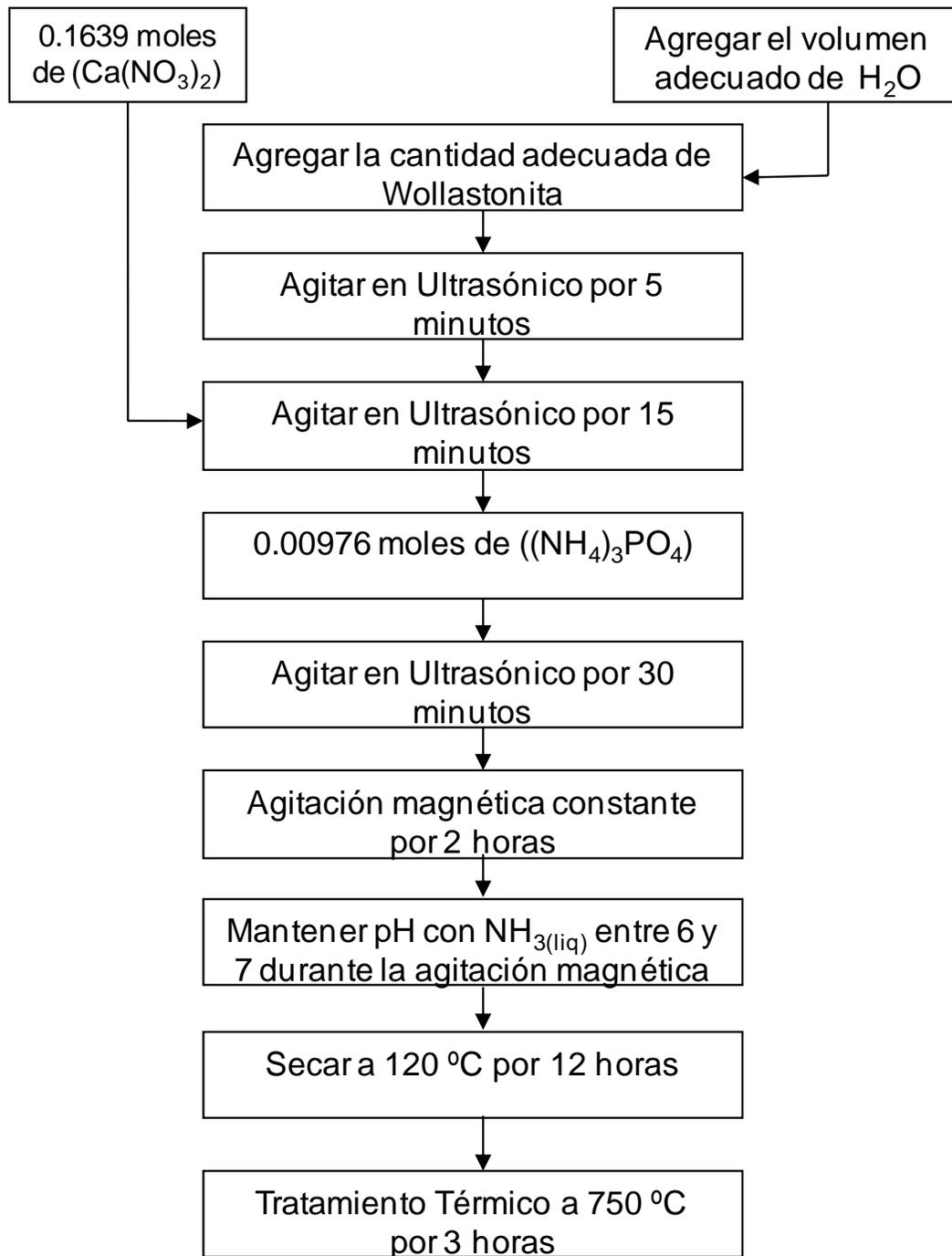


Figura 7. Diagrama de flujo para la síntesis de biocompuestos de Hidroxiapatita-Wollastonita.

3.1.1 Técnicas de Análisis.

Análisis Térmico (ATG/ATD).

Para detectar las transformaciones que ocurren en los materiales con la modificación de su temperatura se utilizó el ATG, en combinación con el ATD. Ambos análisis se desarrollaron en un equipo analizador simultáneo DSC-TGA (TA Instruments SDT 2990, New Castle, DE), mostrado en la Figura 6. El intervalo de calentamiento fue de temperatura ambiente hasta 1000°C , a una velocidad de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ con un flujo de aire de $23\text{ cm}^3/\text{min}$. Se utilizaron 3 mg de muestra colocados sobre 10 mg de alúmina.



Figura 8. Analizador Simultaneo DSC-TGA.

Espectroscopia Infrarroja de Transformadas de Fourier (FT-IR).

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron con un espectrómetro FT-IR Perkin-Elmer Modelo Spectrum GX (Perkin-Elmer, Shelton CT). Las muestras fueron mezcladas con KBr y prensadas para formar pastillas las cuales fueron analizadas en modo de transmisión, en el intervalo de 4000-400 cm^{-1} .

Espectroscopia de Dispersión de Energía (EDS)

Los espectros de dispersión de energía se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido JEOL-5300, (Tokyo, Japan) equipado con un detector de rayos-X característicos para el análisis cualitativo y semicuantitativo de la composición química de las muestras.

Difracción Rayos-X (DRX).

Los patrones de difracción de rayos-X se obtuvieron con un difractómetro de polvos Phillips X'PERT (Phillips Electronics, N.V. Eindhoven, Netherlands), con radiación $\text{CuK}\alpha$ (40 mA, 45 KV) y velocidad de barrido de 1.2^o/min. En ambos casos, variando el ángulo 2θ desde 10^o hasta 80^o.

Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).

Las imágenes de alta resolución y los patrones de difracción de electrones de área selecta (SAED), se obtuvieron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL, JEM-2010F (Tokyo, Japan). Las muestras fueron preparadas por dispersión de los polvos en agua deionizada formando suspensiones muy diluidas. Se coloca una gota de esta suspensión en una rejilla de cobre recubierta con carbón.

Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).

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

Espectroscopia Fotoelectronica de rayos-X

La composición de las capas de apatita neoformada antes y después de la inmersión en la solución SBF se evaluó utilizando un espectroscopio fotoelectrónico de rayos-X CAMECA-MAC-3 (Riber LDM-32, France).

Para evaluar las propiedades biológicas de los biocompuestos *in vitro* se realizaron las pruebas de Bioactividad, mediante la interacción de los materiales con un fluido fisiológico simulado (SBF), similar a la carga iónica del plasma sanguíneo; y Citotoxicidad, mediante la interacción de los materiales con patrones de células de referencia (fibroblastos), 3T3 Cell Line, analizando su morfología, sobrevivencia y proliferación; así mismo, se analizara la habilidad para la adhesión de células osteoblasticas a los materiales de estudio, analizando de igual forma su sobrevivencia en estas condiciones.

3.2 Sinterización de los biocompuestos de Hidroxiapatita-Wollastonita.

Para las pruebas de sinterización, los biocompuestos se molieron mezclados con etanol durante 30 min en un molino de bolas de carburo de tungsteno FritschPulverisette 6 planetary mono mill (Idar-Oberstein, Germany), a una velocidad de 200 rpm. Los materiales molidos se secaron a 120°C para eliminar el etanol y obtener un polvo fino. Se produjeron tabletas cilíndricas mediante presión uniaxial de 0.5 g de polvo colocados en un troquel de 10 cm de diámetro, comprimidos en una prensa CarverpressHydraulicUnit

3912 (Carver Inc., Wabash, IN) a una presión de 220 MPa durante 5 min. Los experimentos de sinterización se desarrollaron en un horno de alta temperatura Thermolyne 46100 (Thermolyne, Bubuque, IA) a 1200°C. El proceso térmico se desarrolló a una velocidad de 2°C/min desde la temperatura ambiente hasta la temperatura de sinterización, manteniéndose a esta temperatura durante 5 h, seguido por un enfriamiento a una velocidad de 2°C/min. Los biocompuestos de Hidroxiapatita-Wollastonita sinterizados contienen 0, 20, 50, 80 y 100% en peso de Wollastonita, identificadas como 100H, 80H-20W, 50H-50W, 20H-80W y 100W respectivamente.

Técnicas de Caracterización de los Biocompuestos de Hidroxiapatita-Wollastonita Sinterizados

Los materiales sinterizados fueron caracterizados usando un difractómetro de rayos X, X'PERT XRD (Phillips Electronics, N.V. Eindhoven, Netherlands) en el rango de 2θ de 20° - 50° . La microestructura de los biocompósitos sinterizados se analizó usando un microscopio electrónico de barrido JEOL 5300 SEM (Tokyo, Japan). La composición elemental de las superficies de los biocompósitos se analizó mediante espectroscopia de dispersión de energía (EDS), y espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X (XPS).

3.3 Evaluación de las propiedades bioactivas de los biocompósitos de Hidroxiapatita-Wollastonita.

Preparación del Fluido Fisiológico Simulado (SBF)

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

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

En la preparación de la solución SBF debe evitarse el uso de recipientes de vidrio, ya que sobre su superficie puede inducirse la nucleación de apatita. En su lugar se deben utilizar recipientes de plástico con superficies suaves.

La solución SBF se preparó en un recipiente de plástico, disolviendo las cantidades apropiadas de cada uno de los reactivos en agua deionizada, añadiéndolos uno por uno, en el orden

indicado anteriormente, hasta que cada reactivo se disolvió completamente. Se consumieron aproximadamente 40 mL de HCl 1M, para ajustar el pH a a 7.4 en 1 L de solución.

Dado que la solución SBF es una solución supersaturada, cualquier método de preparación inapropiado puede generar una precipitación en la solución. Por tal razón, en todo momento durante la preparación se debe distinguir una solución transparente, libre de cualquier indicio de precipitación. Si aparece cualquier tipo de precipitado, la preparación debe detenerse, eliminar la solución y empezar de nuevo.

Para preparar 1 L de solución, primeramente los reactivos se disolvieron en 700 mL de agua deionizada, la cual se ajusta previamente a 37°C en una placa calefactora provista de agitación magnética. Aproximadamente el 90% del ácido clorhídrico se añade antes de agregar el cloruro de calcio.

Después de agregar el sulfato de sodio, el volumen de la solución se ajustó a 900 mL con agua deionizada, manteniendo la temperatura a 37°C.

Se Introdujo el electrodo de pH en la solución, justo antes de agregar el tris-(hidroximetil)aminometano, el pH de la solución se encontró $\approx 2.0 \pm 1.0$.

Se añadió el tris-(hidroximetil)-aminometano poco a poco, esperando a que se disolviera completamente y observando el aumento gradual de pH en la solución, hasta que ésta alcanzó un valor de pH ≈ 7.3 . Este reactivo no debe agregarse de forma rápida, ya que un incremento radical del pH puede ocasionar una precipitación de fosfato de calcio en la solución.

Seguidamente se ajustó la temperatura a 37°C y se agregó más tris-(hidroximetil)-aminometano hasta alcanzar un valor de pH ≈ 7.45 en la solución.

Posteriormente se añadió en gotas la cantidad de HCl 1M necesaria para ajustar el pH ≈ 7.42 , agregando de nuevo la cantidad necesaria de tris-(hidroximetil)-aminometano para volver a alcanzar un pH ≈ 7.45 , para bajarlo de nuevo hasta pH ≈ 7.42 con HCl 1M, repitiendo esta operación hasta que todo el tris-(hidroximetil)-aminometano se agregó a la mezcla, ajustando finalmente el pH ≈ 7.42 con HCl 1M.

Finalmente, se retiró de la solución el electrodo de pH, se lavó con agua deionizada y ésta se agregó a la solución. La solución se retiró del recipiente plástico y se colocó en un recipiente volumétrico, la superficie del recipiente plástico se lavó en repetidas ocasiones con agua deionizada, esta agua de lavado se añadió a la solución aforando aproximadamente hasta la marca de 1 L.

Considerando que la disminución de la temperatura puede afectar el volumen de la solución, el recipiente se tapó, la mezcla se colocó en un baño a 20°C. Una vez que se alcanzó esta temperatura, el recipiente se aforó exactamente a 1 L con agua deionizada.

El fluido se preservó en un recipiente de plástico herméticamente sellado a una temperatura de 5-10°C durante 30 días.

Evaluación de las Propiedades Bioactivas de los Materiales

La bioactividad de los biocompuestos de Hidroxiapatita-Wollastonita se evaluó analizando la nueva capa de apatita formada sobre la superficie de los materiales después de sumergirse en 40 mL de la solución SBF durante 1, 2 y 3 semanas a 37°C, (Figura 9).

Después de cada período de evaluación, las muestras se sacaron de la solución, se lavaron con agua deionizada y se secaron a temperatura ambiente.

Técnicas de Caracterización

El efecto de la interacción de los materiales con el sistema fisiológico simulado, se analizó evaluando las características de las capas formadas sobre de los materiales. La evaluación de la morfología y composición de las capas se evaluó mediante SEM/EDS, utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL 5300 SEM (Tokyo, Japan). Para la determinación de los cambios en la concentración de los iones Ca, P y Si, así como los cambios de pH de la solución SBF durante el período de inmersión de las muestras, se utilizaron los equipos de absorción atómica y colorimetría.

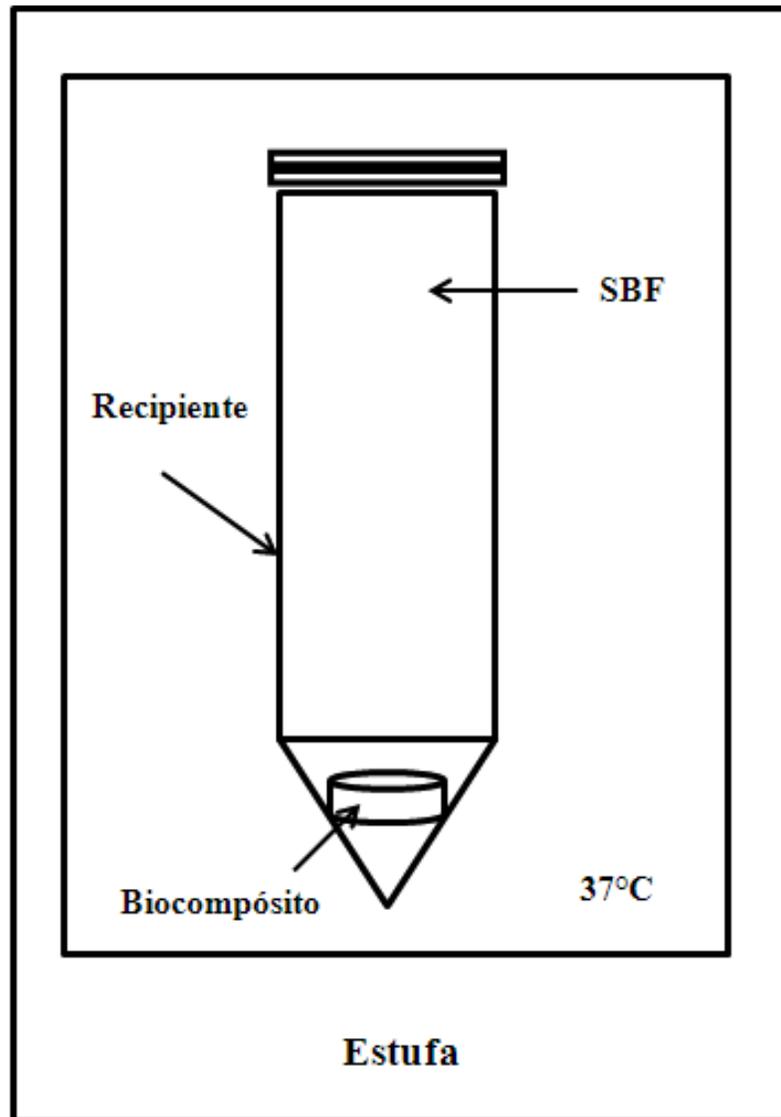


Figura 9. Diagrama esquemático de un material inmerso en solución SBF.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Artículo Publicado.

Nota. A continuación se muestra el artículo en español, el cual fue aceptado para la evaluación escrita.

Abstrac.

La Hidroxiapatita es un tipo de material a base de fosfatos de calcio con gran interés para las aplicaciones biomédicas, debido a la similitud química que presenta este material a la parte mineral del hueso humano. Sin embargo, la Hidroxiapatita sintética es esencialmente frágil; la práctica indica que el uso de Hidroxiapatita sin aditivos para la producción de implantes no es eficiente, debido a su baja resistencia. En el presente trabajo, se sintetizaron biocompósitos de Hidroxiapatita-Wollastonita mediante una ruta sol-gel alternativa, utilizando nitrato de calcio y fosfato de amonio como precursores de Hidroxiapatita, y se añadió Wollastonita natural de alta pureza en proporciones de 20, 50 y 80 por ciento en peso inmersos en medio acuoso. La formación de Hidroxiapatita se produce a una temperatura relativamente baja de aproximadamente 350 °C, mientras que la Wollastonita permanece sin reaccionar. Posteriormente, estos biocompósitos se sinterizaron a 1200 °C durante 5 h para producir materiales densos. Las técnicas de caracterización demostraron la presencia de Hidroxiapatita y Wollastonita como fases únicas en todos los productos.

Palabras clave: Hidroxiapatita; Wollastonita; Biocerámica; Biocompósitos; Sol gel

1. Introducción.

La Hidroxiapatita es el componente mineral predominante de los huesos de los vertebrados y del tejido dental: los dientes y el esmalte. Sus aplicaciones clínicas son de gran importancia, ya que es el fosfato de calcio de cerámica químicamente más similar a los cristales de la apatita biológica. Por esta razón, se han desarrollado muchas rutas de procesamiento para sintetizar la Hidroxiapatita y sinterizar los polvos para formar una biocerámica densa. Los métodos más comunes que se han reportado son: precipitación, reacción en estado sólido, método sol-gel, ruta hidrotérmal, técnicas de emulsión y microemulsión, reacciones mecano-químicas y una combinación de reacciones mecano-químicas, hidrotérmal y las reacciones asistidas por ultrasonido (1 – 4).

El proceso sol-gel es uno de los métodos más importantes para la producción de biomateriales, sus ventajas incluyen el uso de reactivos económicos y fácilmente de encontrar, es un método eficaz para la preparación de los polvos altamente puros debido a la posibilidad de mantener un estricto control de los parámetros durante el proceso.

Este método ofrece una mezcla molecular de calcio y fósforo, mejorando la homogeneidad química. Además, la alta reactividad de los polvos sol-gel permite una reducción de la temperatura durante su procesamiento y de cualquier fenómeno de degradación durante la sinterización (5).

Sin embargo, las propiedades mecánicas de la Hidroxiapatita no son lo suficientemente buenas para ser utilizadas como implantes en situaciones de carga, como dientes artificiales o huesos. Una solución para resolver este problema es combinarlo con una fase de refuerzo adecuada, produciendo un biocompósito que proporciona propiedades mecánicas óptimas, superando las limitaciones mecánicas. El biocompósito ideal debe ser el que combine las propiedades biológicas y mecánicas, para proporcionar un soporte adecuado para los tejidos duros (6, 7).

La Wollastonita, es un silicato de calcio que ha sido ampliamente utilizado como relleno en la fabricación de compuestos con propiedades mecánicas a mejorar. Además, también se ha utilizado como material médico para huesos artificiales y raíces dentales debido a su buena bioactividad y biocompatibilidad que presenta. El hueso natural es un compuesto biocerámico compuesto de pequeñas partículas de cristales de Hidroxiapatita reforzadas por fibras de

colágeno orgánico. Debido a sus excelentes propiedades mecánicas, los investigadores buscaron formas de duplicar sus propiedades mecánicas (8, 9). Kokubo y sus colaboradores trataron de preparar un compuesto similar por medio del proceso de cristalización, desarrollando una cerámica de vidrio clínicamente importante (vitrocerámica A-W) (8, 10). La vitrocerámica A-W es un conjunto de pequeñas partículas de apatita, reforzada por Wollastonita en una matriz vítrea. La resistencia a la flexión, la tenacidad a la fractura y el módulo de Young de la vitrocerámica A-W son las más altas entre el vidrio bioactivo y la vitrocerámica (11). En muchos estudios se han utilizado la Wollastonita en formas naturales o sintéticas para producir diferentes compuestos en los que mejoró algunas propiedades mecánicas, así como la bioactividad y la porosidad de los compuestos (12 – 14). La aplicación de materiales naturales en lugar de materiales sintéticos reduce el costo de la producción de los implantes. Además, a diferencia de los materiales sintetizados, la Wollastonita natural tiene una forma de aguja, con una relación entre la longitud de la aguja y su diámetro igual a 15 - 20 o más. Esto presumiblemente facilitará la producción de una malla de refuerzo entrelazada de agujas de Wollastonita en el compuesto (6).

El objetivo del presente trabajo fue sintetizar y caracterizar los polvos de los biocompósitos de Hidroxiapatita-Wollastonita mediante una ruta sol-gel, utilizando nitrato de calcio y fosfato de amonio como precursores de Hidroxiapatita, y Wollastonita natural de alta pureza como elemento de refuerzo. Estos polvos se sinterizaron para producir materiales densos para la evaluación de sus características estructurales, mientras que sus propiedades bioactivas y mecánicas serán evaluadas en un estudio paralelo.

2. Procedimiento Experimental

2.1. Síntesis Sol-Gel de los polvos de los Biocompósitos de Hidroxiapatita-Wollastonita.

Los biocompósitos de Hidroxiapatita-Wollastonita se prepararon mediante la técnica sol-gel a partir de Nitrato de Calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich USA) y Fosfato Amónico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Sigma, Japan) y Wollastonita Natural de alta pureza, NYAD M200 (CaSiO_3 , de la Minera NYCO ubicada en Hermosillo, Sonora, México) con 98,25% de pureza. La Tabla 4 muestra el análisis químico de la Wollastonita natural utilizada para este estudio (15). Las cantidades de los reactivos precursores se fijaron para mantener la relación molar Ca/P a 1.67

de Hidroxiapatita estequiométrica y se agregaron las cantidades de Wollastonita adecuadas para obtener 20, 50 y 80% en peso.

Composición Química	CaSiO ₃
Componente	Valor Típico (%)
CaO	46.25
SiO ₂	52
Fe ₂ O ₃	0.25
Al ₂ O ₃	0.40
MnO	0.025
MgO	0.50
TiO ₂	0.025
K ₂ O	0.15
%wt. Pérdidas (1000°C)	0.40

Tabla 4. Composición Química de la Wollastonita NYAD® M200, producida por la minera NYCO S.A de C.V. (15).

En primer lugar, para producir aproximadamente 1 g de polvo de Hidroxiapatita pura, se disolvieron 0.1639 moles de Nitrato de Calcio en 10 ml de agua deionizada mediante agitación ultrasónica durante 15 minutos, después se disolvieron 0.0979 moles de Fosfato de Amonio mediante agitación ultrasónica durante 30 minutos. La mezcla de precursores se agitó a temperatura ambiente mediante agitación magnética, durante la agitación magnética se controló el pH de la mezcla entre 6 y 7 con Amoníaco líquido durante aproximadamente 2 h, hasta que se observó la gelificación. El gel se secó a una temperatura de 120°C durante 12 h.

Para producir los biocompósitos de Hidroxiapatita-Wollastonita, se suspendió en agitación ultrasónica una cantidad adecuada de Wollastonita para obtener 20% en peso (0.25 g), 50% en peso (1 g) y 80% en peso (4 g) en un volumen adecuado de agua deionizada para mantener la

relación sólido:líquido a 1:2 (w/v) para todos los experimentos. Seguido de esto, se siguió el mismo procedimiento, descrito anteriormente, hasta que se obtuvieron los geles secos mezclados con Wollastonita natural. Finalmente, los geles secos se molieron hasta obtener un polvo fino y se trataron térmicamente en un horno hasta 750 °C en aire durante 3 h. El calentamiento se realizó a una velocidad de 10 °C/min. El diagrama de flujo de la figura 7 describe el procedimiento experimental completo.

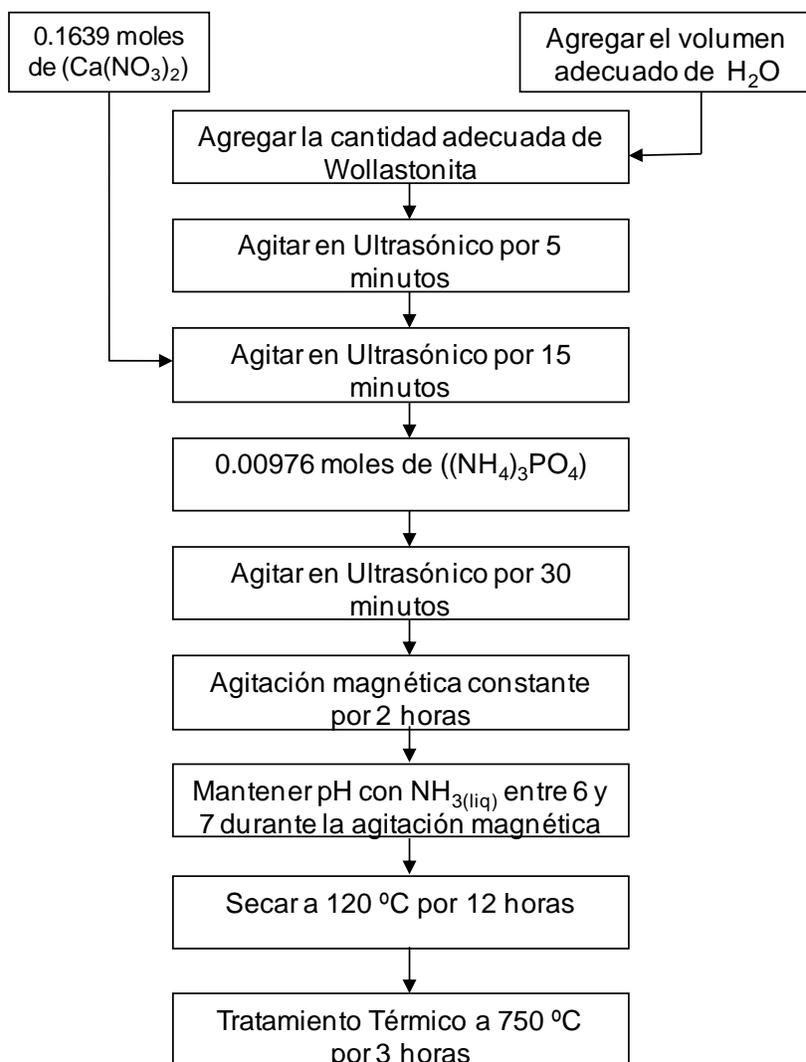


Figura 7. Diagrama de flujo esquemático del procedimiento sol-gel para la síntesis de biocompuestos de Hidroxiapatita-Wollastonita

2.2. Sinterización de los Biocompósitos de Hidroxiapatita-Wollastonita.

Para la sinterización, los polvos se molieron utilizando un molino de bolas en un recipiente de carburo de tungsteno de 50 ml con un molino planetario Fritsch Pulverisette 6 (Idar-Oberstein, Alemania). Se realizaron comprimidos cilíndricos mediante prensado uniaxial de polvos (0.5 g) en un troquel de 10 mm de diámetro en una prensa hidráulica 3912 de Carver Press (Carver, Wabash, IN). La sinterización se llevo a cabo en un horno de alta temperatura Lindberg / Blue M (ThermoScientific, Asheville, NC) a 1200 °C. Los polvos se molieron con isopropanol durante 30 minutos a una velocidad de rotación de 200 rpm. El polvo molido se secó a 120°C para eliminar el isopropanol y producir un polvo fino. Se realizaron comprimidos cilíndricos a una presión de 220 MPa durante un tiempo de 5 min y después se sinterizaron a 1200 °C. El procedimiento de sinterización se realizó a una velocidad de calentamiento de 2 °C/min desde la temperatura ambiente hasta la temperatura de sinterización, con un tiempo de permanencia de 5 horas a la temperatura máxima seguido de un enfriamiento a 2 °C/min. Los comprimidos producidos contienen 0, 20, 50, 80 y 100% en peso de Wollastonita, codificados como 100H, 80H - 20W, 50H - 50W, 20H - 80W y 100W, respectivamente.

2.3. Técnicas de Caracterización.

Se utilizó el análisis térmico para detectar los cambios que se producen durante el proceso de tratamiento térmico. Los análisis termogravimétricos (TGA) y térmicos diferenciales (DTA) se llevaron a cabo utilizando un equipo TA Instruments 2960 simultáneo DSC-TGA (New Castle, DE). El calentamiento fue hasta 1000°C, el cual se realizó en un crisol de alúmina, con flujo de aire (23 cm³/min) a una velocidad de 10 °C/min. El peso de las muestras fue de 3 mg del xerogel seco. El análisis de XRD se realizó por medio de un difractómetro Phillips X'PERT XRD (Phillips Electronics, Eindhoven, Países Bajos). CuK α (40 mA, 40 kV). El rango de 2 θ fue de 10° a 80° a una velocidad de barrido de 1.2°/min. La identificación de las fases cristalinas se realizó comparándola con los archivos JCPDS 09-0432 y 84-0654 para Hidroxiapatita y Wollastonita, respectivamente. Para el análisis de absorción de FT-IR, las muestras se realizaron en pastillas de KBr y se analizaron en el modo de transmisión utilizando un espectrómetro PerkinElmer Spectrum GX System FT-IR (Boston, MA) en el intervalo de 4000-400 cm⁻¹.

Los estudios morfológicos de las muestras se realizaron usando un microscopio electrónico de barrido JEOL SEM 5300 (JEOL, Tokio, Japón). Los estudios de las muestras en el microscopio electrónico de transmisión se realizaron en un equipo JEOL JEM-2010F. Las muestras se prepararon dispersando los polvos en agua destilada para formar suspensiones muy diluidas. Se tomó una gota de suspensión sobre una malla de carbono soportada sobre una microred de cobre convencional.

3. Resultados y discusión

3.1. Síntesis de los Polvos de los Biocompuestos de Hidroxiapatita-Wollastonita.

La figura 10 muestra el análisis termogravimétrico (TGA) combinado con análisis térmico diferencial (DTA) para el gel seco de Nitrato de Calcio y Fosfato de Amonio desde la temperatura ambiente hasta 1000 °C. Las líneas del gel seco muestran una transición térmica en la región de temperatura de 180 °C a 350 °C, lo que corresponde a una pérdida de peso de aproximadamente 40% con un pico exotérmico aproximadamente 280 °C. Esta pérdida de peso podría estar asociada a la formación de Hidroxiapatita en sus primeras etapas de cristalización. Se observa un proceso térmico adicional entre los 500°C y 700°C, correspondiente a una pérdida de peso insignificante, y representada por un pico exotérmico aproximadamente a los 650°C, la cual podría ser debido a la formación de Hidroxiapatita en etapas más avanzadas de cristalización.

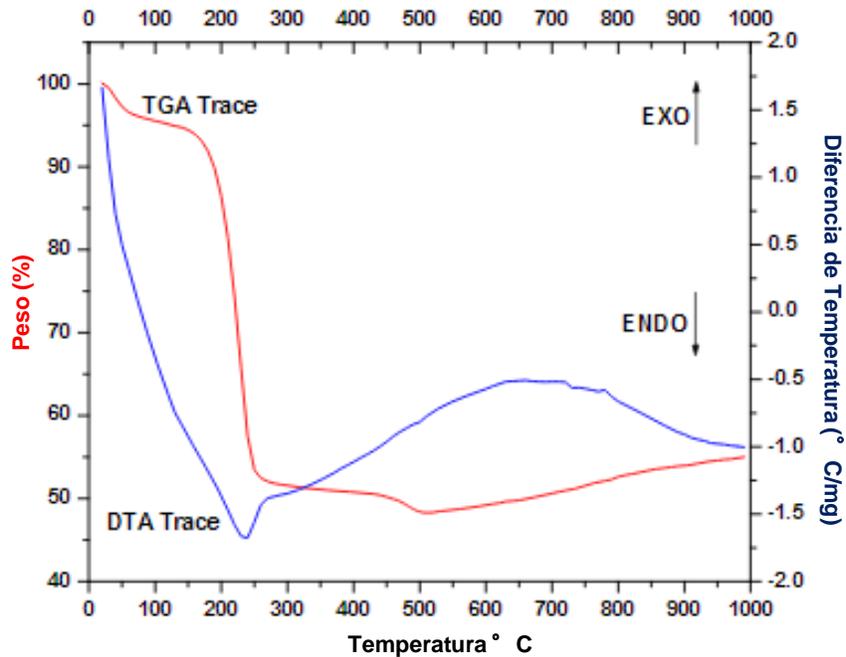


Figura 10. Análisis termogravimétrico y térmico diferencial para gel seco obtenido a partir de Nitrato de Calcio y Fosfato de Amonio inmersos en agua desde la temperatura ambiente hasta 1000 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C / min.

La Figura 11 demostró que la Wollastonita no presenta ninguna transición térmica en todo el intervalo de temperaturas. Este hecho indica que la Hidroxiapatita sintetizada y la Wollastonita natural añadidas para producir los biocompósitos, mantienen su integridad química, incluso bajo condiciones térmicas severas.

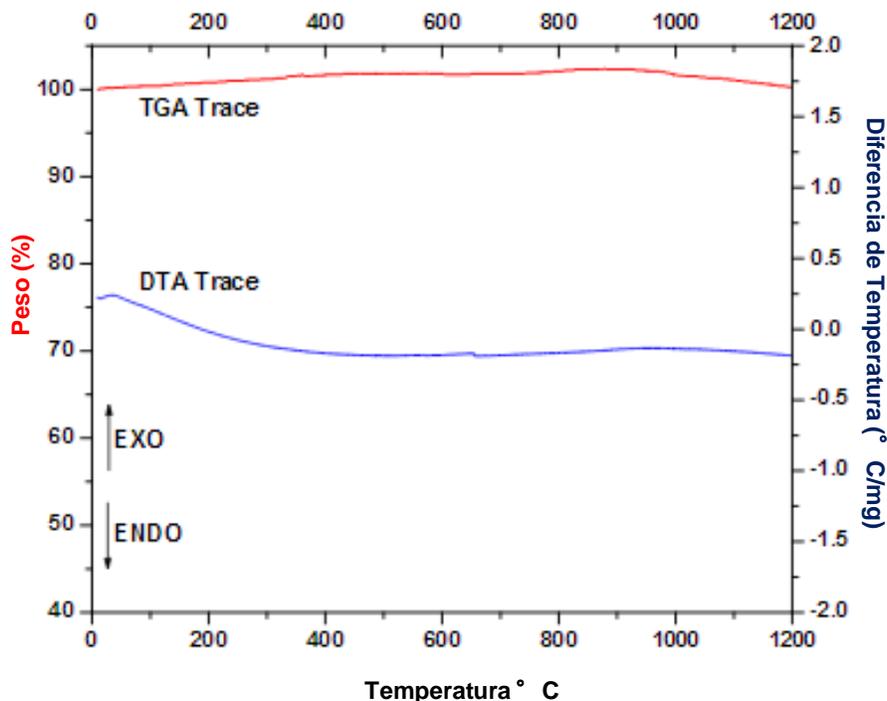


Figura 11. Análisis termogravimétrico y térmico diferencial la Wollastonita natural desde la temperatura ambiente hasta 1000 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C / min.

La Figura 12 muestra los patrones de DRX para el gel seco de Nitrato de Calcio y Fosfato de Amonio en agua después del tratamiento térmico a 350 °C y 750 °C. Esta figura muestra que el gel tratado a 350°C se transforma en Hidroxiapatita en una etapa de cristalización temprana; cuando el gel se trató a 750 °C, se convierte en Hidroxiapatita perfectamente cristalizada. En ambos casos el análisis revela la presencia de Hidroxiapatita como fase individual en los materiales. Por lo anterior, la Hidroxiapatita en los biocompuestos de este estudio, se sintetizó hasta 750 °C para obtener este material biocerámico completamente cristalizado.

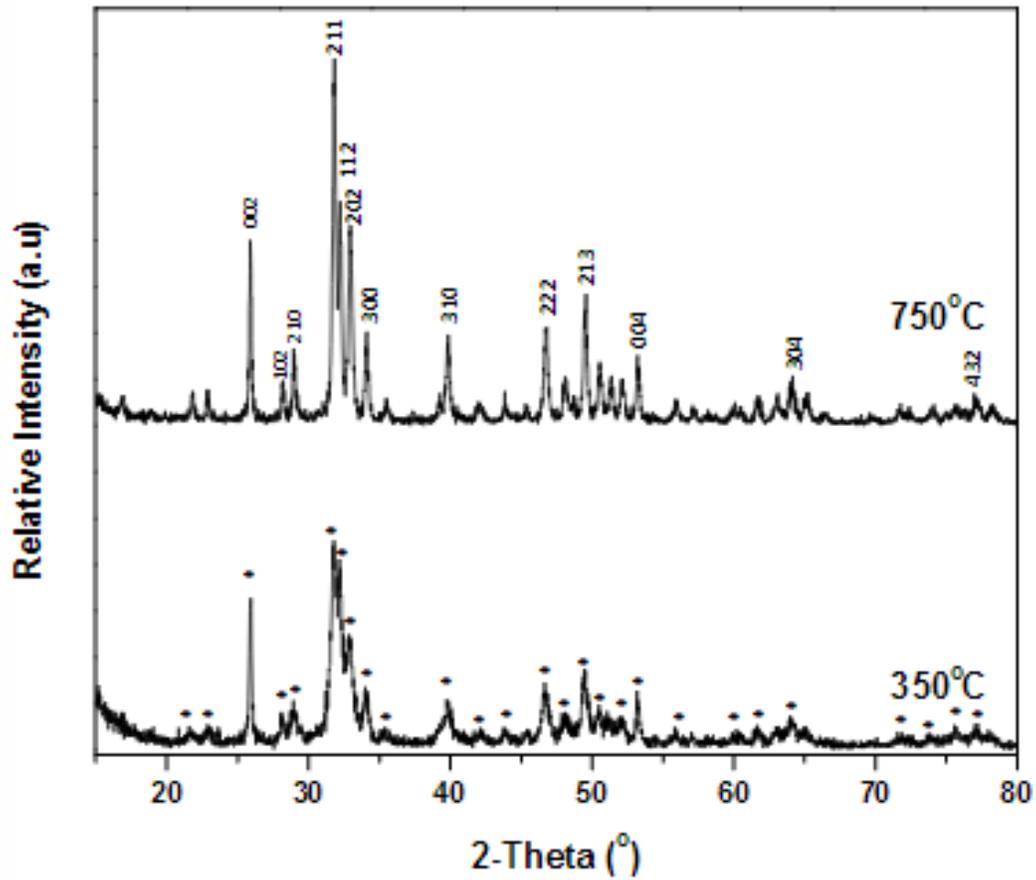


Figura 12. Patrones de difracción de rayos-X del gel seco obtenido a partir de Nitrato de Calcio y Fosfato de Amonio inmersos en agua tratado térmicamente hasta 350°C y 750°C. (*) Hidroxiapatita.

La Figura 13 muestra los espectros de FT-IR para los materiales base. La Figura 5 (a) muestra las características espectrales de la Wollastonita natural y la Figura 5 (b) muestra las características espectrales del gel seco de Nitrato de Calcio y Fosfato de Amonio en agua tratado térmicamente hasta 750 °C, en el intervalo de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} . La banda alrededor de 1000 cm^{-1} de la Figura 5 (a) se atribuye principalmente a la absorción de silicato IR de Wollastonita. Los picos observados alrededor de 3571 cm^{-1} y 632 cm^{-1} de la Figura 5 (b) surgen de los modos de estiramiento y liberación, respectivamente, de los iones OH^- . Los picos a 1048 cm^{-1} y 1090 cm^{-1} se han asociado con el modo de estiramiento de los enlaces P-O, y la banda de 962 cm^{-1} proviene del modo de vibraciones de estiramiento P-O simétrico del grupo de PO_4^{3-} . Las bandas de 603 cm^{-1} y 571 cm^{-1} fueron causadas por la vibración ν_4 triplicada. La clara presencia de los picos a 603 cm^{-1} y 571 cm^{-1} , a lo largo del 632 cm^{-1} confirma la presencia de Hidroxiapatita como fase estequiométrica (6,7,16-18).

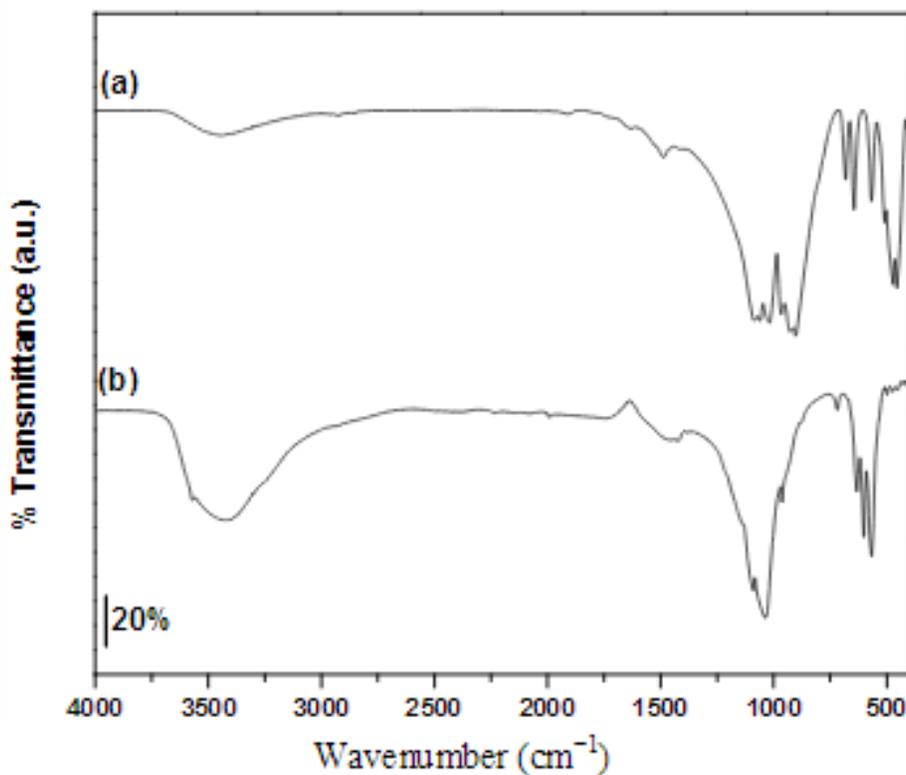


Figura 13. Espectros FT-IR: (a) Wollastonita natural, (b) para del gel seco a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua tratado térmicamente hasta 750°C.

La Figura 14 resume los patrones de difracción de rayos X para Wollastonita natural (100 W) y los geles secos con diferentes porcentajes en peso de Wollastonita (20H - 80W) 80% en peso, (50H - 50W) 50% en peso (80 H - 20 W) 20% en peso (100H) 0% en peso, después del tratamiento térmico hasta 750°C. Esta imagen indica que la Hidroxiapatita y la Wollastonita aparecen como fases únicas en los biocompuestos. En todos los casos se observa que se obtuvo Hidroxiapatita cristalizada. Este hecho demuestra que la Wollastonita permanece sin reaccionar, a lo largo de toda la síntesis in-situ de Hidroxiapatita.

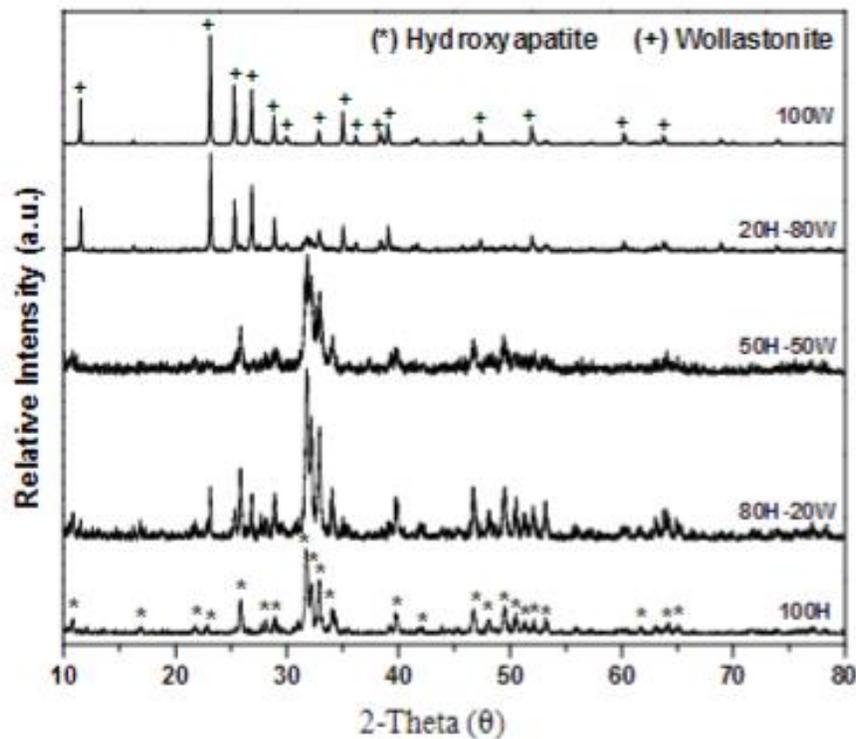


Figura 14. Patrones de difracción de rayos-X de los biomateriales 100%H, 80%H-20%W, 50%H-50%W, 20%H-80%W y 100%W, tratados térmicamente hasta 750°C.

La Figura 15 muestra las micrografías electrónicas de transmisión de Wollastonita natural y geles secos con diferentes porcentajes en peso de Wollastonita tratados térmicamente hasta 750 °C. En esta figura se muestra la forma típica y la morfología acicular de las fibras de Wollastonita, mientras que los granos de Hidroxiapatita muestran su forma típica y su morfología de crecimiento hexagonal (6). Casi todos estos granos tienen un tamaño entre 50 nm y 100 nm. En todos los biocompuestos, los granos de Hidroxiapatita aparecen colocados

entre las fibras de Wollastonita, con la misma forma y tamaño que los observados en los materiales de base. Las partículas de Hidroxiapatita sintetizada se aglomeran homogéneamente sobre la superficie de las fibras de Wollastonita, lo que asegura una interacción eficiente de ambas fases en todos los biocompuestos. Además, las diferentes cantidades de Wollastonita implicadas en la formación de los biocompuestos no afectan las etapas de síntesis y las características finales, tales como la estructura y morfología de la Hidroxiapatita producida. Estas características morfológicas de estos biocompuestos pueden evitar la interacción fibra-fibra directa debido a que las superficies de las fibras de Wollastonita están completamente cubiertas por la Hidroxiapatita. Cualquier otro tratamiento como el prensado y el sinterizado producirán materiales con mayor parte de interacciones de fibra-Hidroxiapatita, ya que cuando las fibras interactúan consigo mismas, en otros estudios (12-14) han informado que estas interacciones afectan algunas de las propiedades físicas y mecánicas de los materiales.

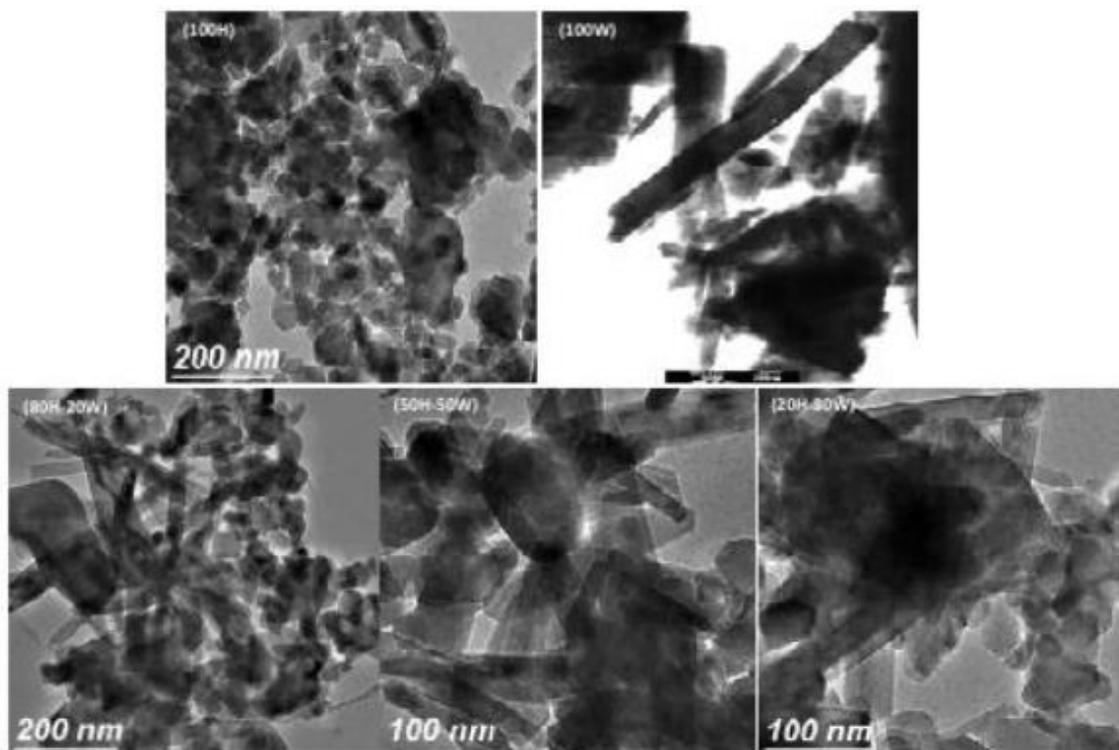


Figura 15. Imágenes en el Microscopio Electrónico de Transmisión de los polvos: Hidroxiapatita (100 H) y Wollastonita (100 W), y los biocompuestos de Hidroxiapatita Wollastonita (80H - 20W, 50H - 50W, 20H - 80W).

3.2. Sinterización de Biocompósitos de Hidroxiapatita-Wollastonita.

Las figuras 16 y 17 muestran las micrográficas electrónicas de barrido de los comprimidos cilíndricos de Wollastonita natural (100 W), e Hidroxiapatita sintetizada (100 H), y de los biocompósitos de Hidroxiapatita-Wollastonita con diferentes porcentajes en peso de Wollastonita (20 H - 80 W) 80 % en peso, (50H - 50W) 50% en peso, (80H - 20W) 20% en peso, sinterizado a 1200°C durante 5 h. Después de que los polvos fueron sinterizados, las superficies de todos los materiales muestran una apariencia microcristalina compacta con límites claros de cristal y algunos microporos. Este hecho demuestra que los biocompósitos sinterizados de Hidroxiapatita-Wollastonita no eran completamente densos en las condiciones de procesamiento de este estudio. Aunque se podría pensar que esta porosidad podría tener un efecto negativo en las propiedades mecánicas, la porosidad en realidad aumenta las propiedades bioactivas, porque los poros aumentan la penetración de soluciones fisiológicas en las muestras y permiten el crecimiento cristalino de la apatita ósea hacia la superficie, lo que resulta en propiedades bioactivas más eficientes (7, 19). Por lo tanto, la relación apropiada entre la porosidad y el comportamiento mecánico en estos materiales tiene importantes implicaciones en la regeneración ósea. En consecuencia, en un estudio complementario se analizará el efecto de la porosidad y se evaluará su relación con la microestructura y las propiedades mecánicas de los materiales.

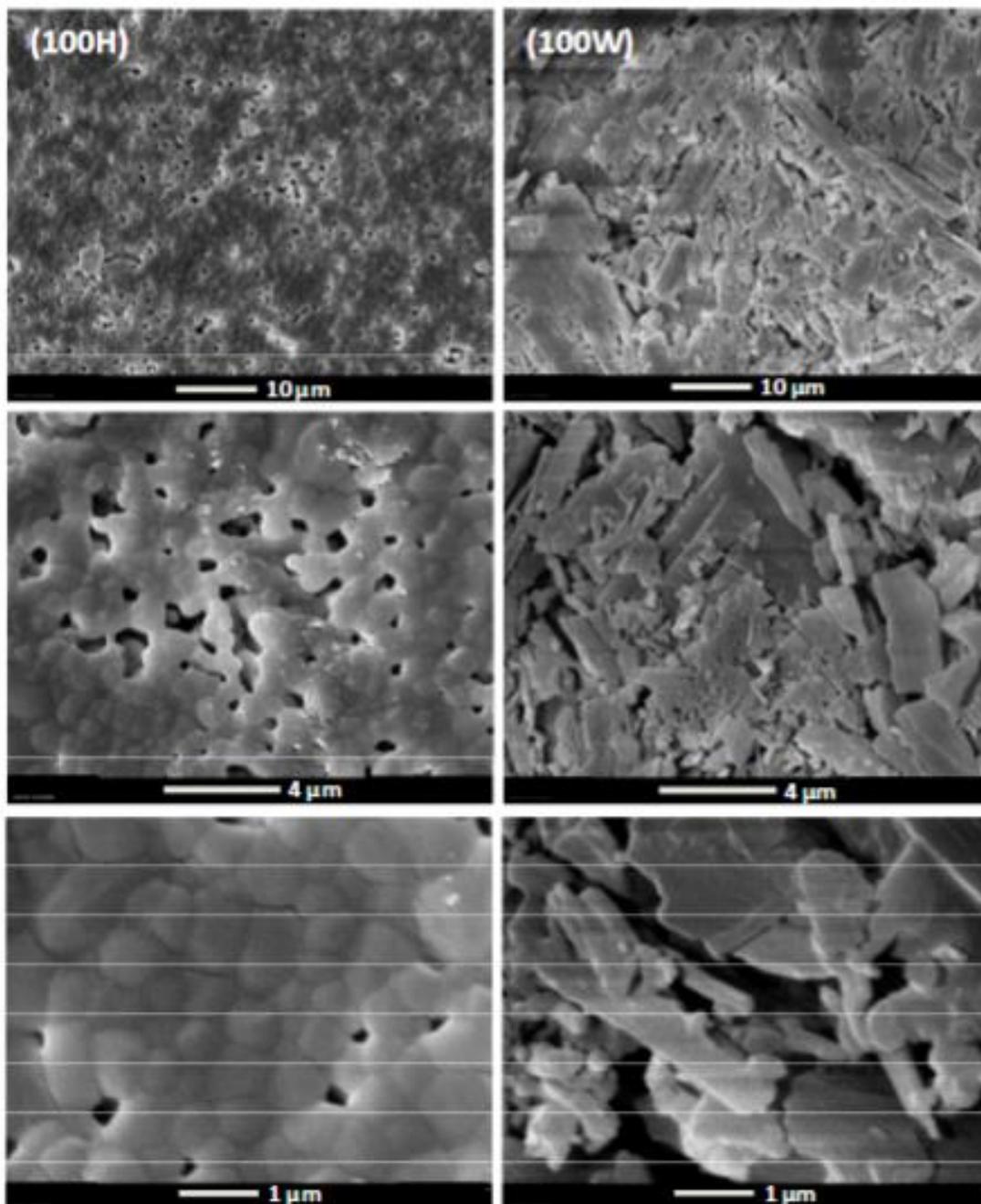


Figura 16. Micrográficas electrónicas de barrido de los materiales base: Hidroxiapatita (100 H) y Wollastonita natural (100 W) sinterizado a 1200°C durante 5 h, a diferentes magnitudes.

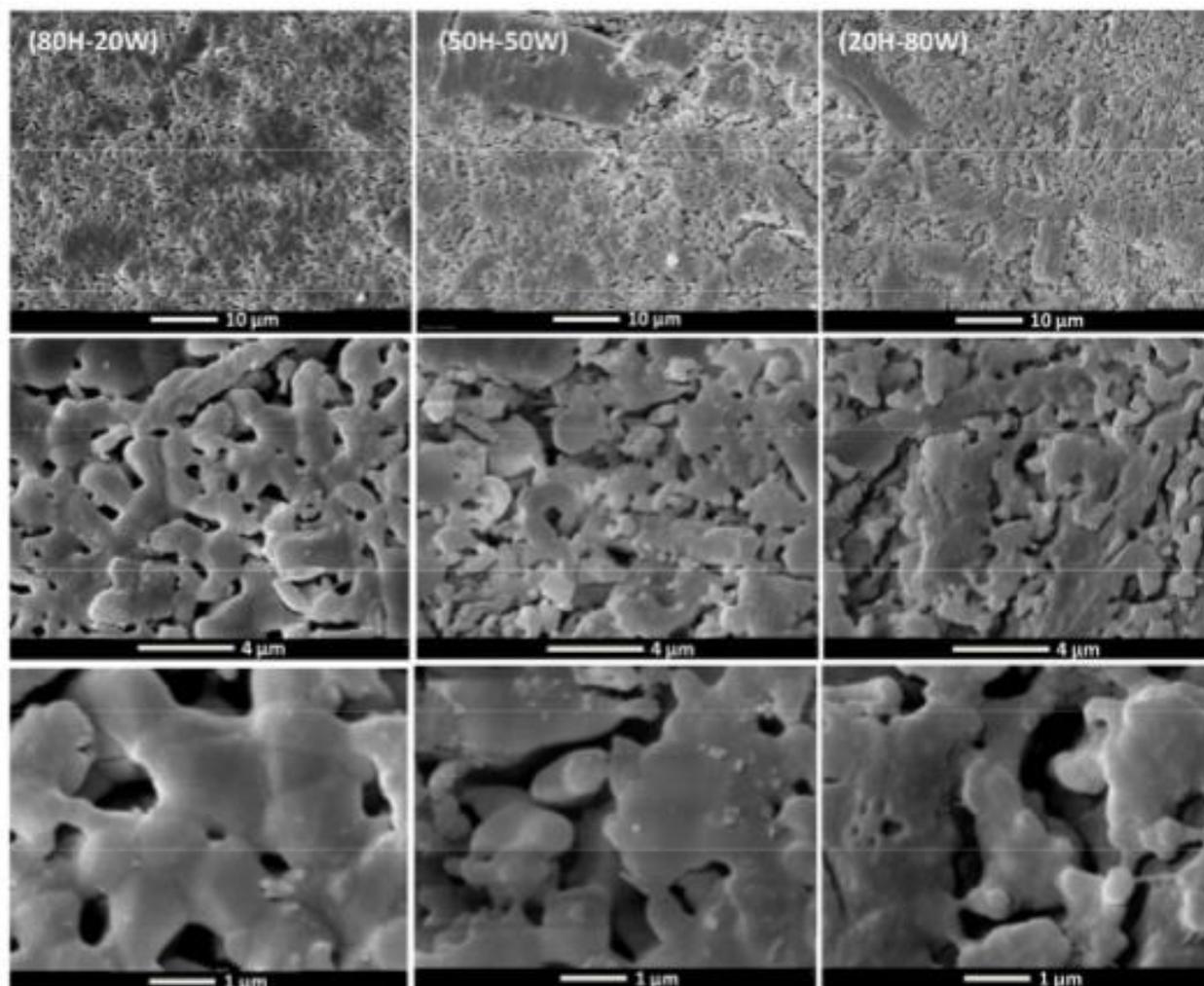


Figura 17. Micrografías electrónicas de barrido de los biocompuestos sintéticos de Hidroxiapatita-Wollastonita (80H-20W), (50H-50W), (20H-80W) sinterizados a 1200 ° C durante 5 h, a diferentes magnitudes.

4. Conclusiones

Los biocompuestos de Hidroxiapatita-Wollastonita se sintetizaron usando una ruta sol-gel alternativa utilizando Nitrato de Calcio y Fosfato de Amonio como precursores de Hidroxiapatita, y Wollastonita natural de alta pureza como fase de refuerzo inmersos en medio acuoso. La formación de Hidroxiapatita en los biocompuestos se produce a una temperatura relativamente baja de aproximadamente 350°C en las primeras etapas de cristalización. Un tratamiento térmico adicional hasta aproximadamente 750°C produce Hidroxiapatita completamente cristalizada, mientras que la Wollastonita permanece sin reaccionar. Las partículas de Hidroxiapatita aparecen aglomeradas sobre la superficie de las fibras de Wollastonita. Los polvos de los biocompuestos de Hidroxiapatita-Wollastonita sinterizados a 1200 °C durante 5 h, no experimentan descomposición significativa con este tratamiento térmico. La Hidroxiapatita y la Wollastonita permanecen como fases simples en todos los biocompuestos sinterizados exhibiendo cierto grado de porosidad. Aunque esta porosidad podría tener un efecto negativo en las propiedades mecánicas, es importante asegurar la integración eficiente de estos materiales con tejidos óseos, que podrían ser modulados para variar las cantidades de materiales de base en los biocompuestos.

5. Agradecimientos.

Los autores agradecen a Francisco Brown Bojórquez y Víctor Emmanuel Alvarez Montaña de DIPyM-UNISON, Israel Gradilla, Eloisa Aparicio, Jesús Antonio Díaz, David Domínguez, Eric Flores Aquino y Jaime Mendoza López de CNyN-UNAM por su apoyo en la caracterización y discusiones. Este trabajo fue parcialmente apoyado por PACAC UNISON-UNAM a través del proyecto Px-864 y DGAPA-PAPIIT-UNAM a través de la subvención IN207511.

Referencias del Artículo.

- (1) L. L. Hench, "Bioceramics: From Concept to Clinic," *Journal of the American Ceramic Society*, Vol. 74, No. 7, 1991, pp. 1487-1510.
- (2) R. Z. LeGeros, "Calcium Phosphate Materials in Restorative Dentistry: A Review," *Advances in Dental Research*, Vol. 2, No. 1, 1998, pp. 164-180.

- (3) R. Z. LeGeros and J. P. LeGeros, "Dense Hydroxyapatite," In: L. L. Hench and J. Wilson, Eds., *An Introduction to Bioceramics*, World Scientific, Singapore, 1993, pp. 139-180.
- (4) R. Petit, "The Use of Hydroxyapatite in Orthopaedic Surgery: A Ten-Year Review," *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*, Vol. 9, No. 2, 1999, pp. 71-74.
- (5) G. Bezzi, G. Celotti, E. Landi, T. M. G. La Torretta, I. Sopyan and A. Tampieri, "A Novel Sol-Gel Technique for Hydroxyapatite Preparation," *Materials Chemistry and Physics*, Vol. 78, No. 3, 2003, pp. 816-824.
- (6) M. A. Encinas-Romero, S. Aguayo-Salinas, S. J. Castillo, F. F. Castellón-Barraza and V. M. Castaño, "Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite-Wollastonite Composite Powders by Sol-Gel Processing," *International Journal of Applied Ceramic Technology*, Vol. 5, No. 4, 2008, pp. 401-411. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7402.2008.02212.x>
- (7) M. A. Encinas-Romero, S. Aguayo-Salinas, J. L. Valenzuela-García, S. R. Payán and F. F. Castellón-Barraza, "Mechanical and Bioactive Behavior of Hydroxyapatite-Wollastonite Sintered Composites," *International Journal of Applied Ceramic Technology*, Vol. 7, No. 2, 2010, pp. 164-167.
- (8) T. Kokubo, "A/W Glass-Ceramic: Processing and Properties," In: L. L. Hench and J. Wilson, Eds., *An Introduction to Bioceramics*, World Scientific, Singapore, 1993, pp. 75-88.
- (9) M. J. Olszta, X. Cheng, S. S. Jee, R. Kumar, Y. Kim, M. J. Kaufman, E. Douglas and L. B. Gower, "Bone Structure and Formation: A New Perspective," *Materials Science and Engineering: R*, Vol. 58, No. 3, 2007, pp. 77-116.
- (10) T. Yamamuro, "A/W Glass-Ceramic: Clinical Applications," In: L. L. Hench and J. Wilson, Eds., *An Introduction to Bioceramics*, World Scientific, Singapore, 1993, pp. 89-103.
- (11) S. M. Best, A. E. Porter, E. S. Thian and J. Huang, "Bioceramics: Past, Present and for the Future," *Journal of the European Ceramic Society*, Vol. 28, No. 7, 2008, pp. 1319-1327.

(12) Y. E. Greish and P. W. Brown, "Characterization of Wollastonite-Reinforced Hap-Ca polycarboxylate Composites," *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 55, No. 4, 2001, pp. 618-628.

(13) V. V. Shumkova, V. M. Pogrebenkov, A. V. Karlov, V. V. Kozik and V. I. Vereshchagin, "Hydroxyapatite-Wollastonite Bioceramics," *Glass Ceramic*, Vol. 57, No. 9-10, 2000, pp. 350-353.

(14) H.-S. Ryu, J. K. Lee, H. Kim and K. S. Hong, "New Type of Bioactive Materials: Hydroxyapatite-Wollastonite Composites," *Journal of Materials Research*, Vol. 20, No. 5, 2005, pp. 1154-1162.

(15) NYCO Minerals Inc., "Premium Quality Wollastonite NYAD M325," NYCO IN-299-04-01 Booklet, NYCO Minerals, Willsboro, 2001.

(16) M. Markovic and B. O. Fowler, "Preparation and Comprehensive Characterization of a Calcium Hydroxyapatite. Reference Material," *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, Vol. 109, No. 6, 2004, pp. 553-568.

(17) P. N. de Aza, F. Guitián and C. Santos, "Vibrational Properties of Calcium Phosphate Compounds. 2. Comparison between Hydroxyapatite and β -Tricalcium Phosphate," *Chemistry of Materials*, Vol. 9, No. 4, 1997, pp. 916-922.

<http://dx.doi.org/10.1021/cm9604266>

(18) C. Paluszkiwicz, M. Blazewicz, J. Podporska and T. Gumuła, "Nucleation of Hydroxyapatite Layer on Wollastonite Material Surface: FTIR Studies," *Vibrational Spectroscopy*, Vol. 48, No. 2, 2008, pp. 263-268.

(19) M. Kawata, H. Uchida, K. Itatani, I. Okada, S. Koda and M. Aizawa, "Development of Porous Ceramics with Well-Controlled Porosities and Pores Size from Apatite Fibers and their Evaluation," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 15, No. 7, 1998, pp. 817-823.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Por medio de esta técnica se sintetizó Hidroxiapatita, mediante un método sencillo y práctico, el cual requiere de aproximadamente de 3 horas para producir el xerogel activo que dará lugar a este compuesto.
- Las técnicas de caracterización demostraron que la Hidroxiapatita se produce aproximadamente a 350°C en fase pura y en sus primeras etapas de cristalización.
- Un tratamiento térmico adicional a 750°C dio lugar a la producción de Hidroxiapatita perfectamente cristalizada, manteniéndose como fase única en el producto final.
- Esta serie de etapas pueden desarrollarse en un lapso de tiempo de aproximadamente 20 horas.
- La fase de Wollastonita permanece sin reaccionar a lo largo de todo el proceso de síntesis y sinterización.
- Los biocompuestos de Hidroxiapatita-Wollastonita, comprimidos en forma de tabletas, se sinterizaron a 1200°C durante 5 h. Los análisis de DRX demostraron que estos materiales no experimentan transformaciones significativas durante este tratamiento, no encontrándose la presencia de nuevas fases, producto de la descomposición de los materiales base.
- El análisis de bioactividad de los biocompuestos, mediante su interacción con un fluido fisiológico simulado, durante varios periodos de tiempo, reveló la formación de una capa de apatita neoformada sobre sus superficies, similares a las apatitas biológicas que componen el tejido óseo.

- Mediante las técnicas SEM, XRD, Absorción Atómica y Colorimetría se demostró que la formación de esta capa de apatita, se lleva a cabo mediante un mecanismo de disolución-precipitación.
- La proporción de Wollastonita en los materiales, repercutió en su respuesta bioactiva de manera favorable.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

1. R. González , F. Bardoní , H. Maestre, O. Pereda , E. Pancorbo , M. Cienaga, Long-termsresults of theCorallinePorousHydroxyapatite HAP-200 as bone implant's biomaterial in Orthopedics and Traumatology RevistaCienciasBiológicas CENIC, 2001.
2. B. Ratner and A. Hoffman, "Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine". Academic Press. 1996. 473 p.
3. L Boskey-Adele, "Amorphous Calcium Phosphate: The Contention of Bone". Journal of Dental Research; Houston; Aug 1997. Vol. 76 No 8 p. 1433-1439.
4. B. Harry-Skinner "Diagnostico y Tratamiento en Ortopedia. Manual Moderno", 2da edición, México D.F. 2004
5. M.A. Encinas-Romero, S. Aguayo-Salinas, S.J. Castillo, F.F. Castillon-Barraza, and V.M. Castano, "Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite-Wollastonite Composite Powders by Sol-Gel Processing," Int J. Appl. Ceram. Technol., 5 [4] 401–411 (2008).
6. S.M. Best, A.E Porter, E.S. Thian, and Huang, "Bioceramics: Past, Present and for the Futura, " Journal of the European Ceramic Society, 28[7] 1319-1327 (2008)
7. M.A. Encinas-Romero, S. Aguayo-Salinas, J.L. Valenzuela-Garcia, S.R.Payan and F.F. Castillon-Barraza, "Mechanical and Bioactive Behavior of Hydroxyapatite-Wollastonite Sintered Composites," Int J. Appl. Ceram. Technol., II [II] 1–14 (2009).
8. González R., Bardoní F., Maestre H., Pereda O., Pancorbo E., Cienaga M. Long-terms results of the Coralline Porous Hydroxyapatite HAP-200 as bone implant's biomaterial in Orthopedics and Traumatology RevistaCienciasBiológicas CENIC, 2001.

9. Gimeno M. "Sustitutitos Óseos en Fracturas de Radio Distal". Patología Aparato locomotor. 5 (S2) : 82-90, 2007.
10. Angermann P: "Commercially Available Substitutes for Transplants of Human Bone". Ugeskr-laeger. 154(6) : 333-6, 1992.
11. J. Y. Wong, J.D. Bronzino. Biomaterials. CRS Press, Boca Raton, FL. 1.1: 5-16, 2.2: 40, 4: 96. 2006.
12. K.C. Dee, D.A. Puleo, R. Bizios. An Introduction To Tissue-Biomaterials Interactions. WILEY-LISS, New Jersey. 1.1:1 - 2, 1.3: 6 – 11. 2002.
13. BOSKEY Adele L. "Amorphous Calcium Phosphate: The Contention of Bone". Journal of Dental Research; Houston; Aug 1997. Vol. 76 No 8 p. 1433-1439.
14. RATNER, B. and Hoffman, A. "Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine". Academic Press. 1996. 473 p.
15. PUTLAYEV, Valery. "CalciumPhosphates". Departamento de Química de la Universidad de Moscú. www.hsms.msu.ru/pdf/bio-dresden.ppt. Página consultada en marzo de 2005.
16. Harry B. Skinner "Diagnostico y Tratamiento en Ortopedia. Manual Moderno", 2da edición, México D.F. 2004.
17. U.S. Geological Survey and U.S. Department of the Interior, "Wollastonite-A Versatile Industrial Mineral," FS-002-01 *Booklet*, USGS Science for a changing world, Denver, CO, 2001.
18. M.A. Encinas-Romero, "Sintesis y Caracterizacion de Compositos de Hidroxiapatita-Wollastonita, Preparados Mediante la Tecnica Sol-Gel," *Tesis Doctoral*, Universidad de Sonora. Hermosillo Sonora, Mexico.
19. J. L. Sang, J. Choong-Hwan, L. Man-Jong, "Synthesis and Sintering Behavior of Wollastonite Fabricated by a Polymer Solution Technique," *J. Ceram. Res.*, 6 [4] 298-301 (2005).

-
20. M. Vallet-Regí, "Ceramics for Medical Applications". *The Royal Society of Chemistry*, 97-108 (2001).
 21. T. Kokubo and H. Takadama, "How Useful is SBF in Predicting *In vivo* Bone Bioactivity," *Biomaterials*, 27 2907-2915 (2006).
 22. L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, T. K. Greenlee, "Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramics Prosthetic Materials". *J. Biomed. Mater. Res.*, [2] 117-41 (1972).
 23. M. Vallet- Regí, "Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos"Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Universidad Complutense.28040, Madrid.
 24. M. Vallet-Regí, " Biomateriales: Repuestos para el cuerpo humano" Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Universidad Complutense, Madrid.
 25. B. Valdez, M. Schorr, E. Valdez, M. Carrillo, "Biomateriales para la rehabilitación del cuerpo humano", *Ciencia y Desarrollo*, 2-10 (2005)
 26. E.Peón-Avés, E. Fernández-Escalante, A. Jiménez-Morales, M. Caridad-García, J.C. Galván, M.L. Escudero, "Preparación de recubrimientos de hidroxiapatita a partir de precursores de tipo sol-gel", *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 37 [2] 51-54 (2006).
 27. Jaffe W y Scott B. Current conceps review. Total hip arthroplasty with hydroxiapatitecoatedprotheses. *J Bone Joint Surg Am* 1996; 78:1918-1934.

ANEXOS

Artículo de tesis publicado en una revista internacional.

Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2013, 4, 327-333
<http://dx.doi.org/10.4236/jbnb.2013.44041> Published Online October 2013 (<http://www.scirp.org/journal/jbnb>)



Synthesis and Structural Characterization of Hydroxyapatite-Wollastonite Biocomposites, Produced by an Alternative Sol-Gel Route

Martín A. Encinas-Romero^{1*}, Jesús Peralta-Haley², Jesús L. Valenzuela-García¹, Felipe F. Castellón-Barraza³

¹Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Universidad de Sonora, Hermosillo, México; ²Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química, Universidad de Sonora, Hermosillo, México; ³Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ensenada B.C., México.
 Email: maencinas@iq.uson.mx

Received July 20th, 2013; revised August 18th, 2013; accepted September 3rd, 2013

Copyright © 2013 Martín A. Encinas-Romero *et al.* This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT

Hydroxyapatite is a type of calcium phosphate-based material with great interest for biomedical applications, due to the chemical similarity between this material and the mineral part of human bone. However, synthetic hydroxyapatite is essentially brittle; the practice indicates that the use of hydroxyapatite without additives for implant production is not efficient, due to its low strength parameters. In the present work, biocomposites of hydroxyapatite-wollastonite were synthesized by an alternative sol-gel route, using calcium nitrate and ammonium phosphate as precursors of hydroxyapatite, and high purity natural wollastonite was added in ratios of 20, 50 and 80 percent by weight immersed in aqueous medium. Formation of hydroxyapatite occurs at a relatively low temperature of about 350°C, while the wollastonite remains unreacted. After that, these biocomposites were sintered at 1200°C for 5 h to produce dense materials. The characterization techniques demonstrated the presence of hydroxyapatite and wollastonite as unique phases in all products.

Keywords: Hydroxyapatite; Wollastonite; Bioceramics; Biocomposites; Sol-Gel

1. Introduction

Hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), is the predominant mineral component of vertebrate bones and dental tissue: teeth and enamel. Its clinical applications are of great importance, because it is the calcium phosphate ceramic chemically more similar to the biological apatite crystals. For this reason, many processing routes have been developed for synthesizing fine hydroxyapatite and sintering the reactive powders to form a dense bioceramic. The most common approaches reported include precipitation, solid state reaction, sol-gel methods, hydrothermal route, emulsion and microemulsion techniques, mechanochemical reactions, and a combination of mechanochemical, hydrothermal, and ultrasonically assisted reactions [1-4]. The sol-gel process is one of the most important methods for the production of biomaterials, its advantages include the use of inexpensive and readily available reagents, and

it is an effective method for the preparation of highly pure powder due to the possibility of a strict control of the process parameters. This method offers a molecular mixing of calcium and phosphorus, capable of improving chemical homogeneity. Moreover, the high reactivity of the sol-gel powders allows a reduction of the processing temperature and of any degradation phenomena during sintering [5].

However, the mechanical properties of hydroxyapatite are not good enough to be used as an implant in load bearing situations, like artificial teeth or bones. One approach to solve this problem is to combine it with a suitable reinforcement phase, producing a biocomposite which provides optimum mechanical properties, by overcoming mechanical limitations. The ideal biocomposite should be the one that who combines their biological and mechanical properties, to provide adequate support for the hard tissues [6,7].

Wollastonite (CaSiO_3), is a calcium silicate which has

*Corresponding author.

been widely used as a filler to fabricate composites with improved mechanical properties. Moreover, it has also been used as a medical material for artificial bones and dental roots because of its good bioactivity and biocompatibility. Natural bone is a bioceramic composite made up of small hydroxyapatite crystal particles reinforced by organic collagen fibers. Because of its outstanding mechanical properties, researchers sought ways of duplicating its mechanical properties [8,9]. Kokubo and colleagues attempted to prepare a similar composite by the crystallization process, developing a clinically important glass ceramic (A-W glass-ceramic) [8,10]. A-W glass-ceramic is an assembly of small apatite particles, effectively reinforced by wollastonite in a glassy matrix. The bending strength, fracture toughness, and Young's modulus of A-W glass-ceramic are the highest among bioactive glass and glass-ceramics [11]. Many studies have involved the wollastonite phase in natural or synthetic forms to produce different composites in which its presence improved some mechanical properties as well as the bioactivity and porosity of the composites [12-14]. The application of extra-pure natural materials instead of synthetic materials reduces the cost of implant production. Also, as distinct from synthesized materials, natural wollastonite has a needle-shaped habit, with a ratio between the needle length and their diameter equal to 15 - 20 or more. This will presumably facilitate the production of an interwoven reinforcing mesh of wollastonite needles in the composite [6].

The aim of the present work was to synthesize and characterize hydroxyapatite-wollastonite biocomposite powders by a sol-gel route, using calcium nitrate and ammonium phosphate as precursors of hydroxyapatite, and high-purity natural wollastonite as a reinforcement element. These powders were processed by sintering to produce dense materials for the evaluation of their structural characteristics, whereas their bioactive and mechanical properties will be evaluated in a parallel study.

2. Experimental Procedure

2.1. Sol-Gel Synthesis of Hydroxyapatite-Wollastonite Biocomposite Powders

The biocomposites of hydroxyapatite-wollastonite were prepared by sol-gel processing from calcium nitrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich USA) and ammonium phosphate ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Sigma, Japan) and high-purity natural wollastonite, NYAD M200 (CaSiO_3 , from NYCO's Pílares deposit in Hermosillo, Sonora, México), with 98.25% purity. Table 1 shows the chemical analysis of the natural wollastonite used in this study [15]. The amounts of the precursors reagents were chosen in order

Table 1. Chemical composition of wollastonite NYAD[®] M200, produced by Minera NYCO S.A. de C.V. [15].

Chemical composition	CaSiO ₃
Component	Typical value (%)
CaO	46.25
SiO ₂	52.00
Fe ₂ O ₃	0.25
Al ₂ O ₃	0.40
MnO	0.025
MgO	0.50
TiO ₂	0.025
K ₂ O	0.15
wt% loss (1000°C)	0.40

to maintain the Ca/P molar ratio at 1.67 of stoichiometric hydroxyapatite, and the amounts of wollastonite were chosen in order to obtain 20, 50, and 80 wt%.

First, to produce about 1.0 g of pure hydroxyapatite powder, 0.1639 mol of calcium nitrate was dissolved in 10 mL of deionized water by ultrasonic stirring during 15 minutes, and then 0.0979 mol of ammonium phosphate was dissolved by ultrasonic stirring during 30 minutes.

The mixture of precursors was stirred at room temperature by magnetic stirring, while the pH of the mixture was controlled between 6 and 7 with liquid ammonia for approximately 2 h, until the gelation was observed. The gel was then dried at 120°C for 12 h.

To produce the hydroxyapatite-wollastonite biocomposites, a suitable amount of wollastonite to obtain 20 wt% (0.25 g), 50 wt% (1.0 g), and 80 wt% (4.0 g) was suspended, by ultrasonic stirring, in a proper volume of deionized water to keep the solid: liquid ratio at 1:2 (w/v) for all experiments. Then the same procedure, as described previously, was followed until the dried gels mixed with natural wollastonite were obtained.

Finally, the dried gels were ground to a fine powder and heat treated in a furnace at 750°C in air for 3 h; the heating was done at a rate of 10°C/min. The flow chart in Figure 1 outlines the complete experimental procedure.

2.2. Sintering of Hydroxyapatite-Wollastonite Biocomposites

For sintering experiments, the powders were ground using tungsten carbide milling balls in a 50 mL tungsten carbide container with a Fritsch Pulverisette 6 planetary mono mill (Idar-Oberstein, Germany). Cylindrical tablets were produced by uniaxial pressing of powders (0.5 g) into a 10 mm diameter die in a Carver press Hydraulic Unit 3912 (Carver, Wabash, IN). Sintering tests were carried out in a Lindberg/Blue M high temperature fur-

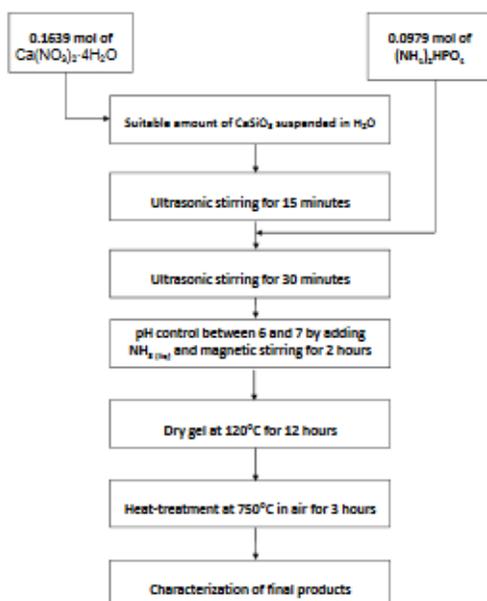


Figure 1. Schematic flow chart for the sol-gel procedure for synthesizing hydroxyapatite-wollastonite biocomposites.

nance (ThermoScientific, Asheville, NC) at 1200°C. The powders were ground in isopropanol for 30 min at a rotation speed of 200 rpm. The milled powder was dried at 120°C to remove the isopropanol and produce a fine powder. Cylindrical tablets were produced by pressing the powders under a pressure of 220 MPa for a 5 min dwell time and then sintered at 1200°C. The sintering procedure was performed at a heating rate of 2°C/min from room temperature to the sintering temperature, with a dwell time of 5 h at the maximum temperature followed by cooling at 2°C/min. The tablets produced contain 0, 20, 50, 80, and 100 wt% of wollastonite, coded as 100 H, 80 H - 20 W, 50 H - 50 W, 20 H - 80 W and 100 W, respectively.

2.3. Characterization Techniques

Thermal analysis was used to detect changes occurring during the heat-treatment process. Thermogravimetric (TGA) and differential thermal analyses (DTA) were carried out using a TA Instruments SDT 2960 Simultaneous DSC-TGA (New Castle, DE). Heating to 1000°C was performed in an alumina crucible, with air flow (23 cm³/min) at a rate of 10°C/min. The samples' weight was 3 mg of dried xerogel. XRD analysis was carried out by means of a Phillips X'PERT XRD diffractometer (Phillips Electronics, Eindhoven, The Netherlands). CuK α

radiation was used (40 mA, 40 kV). The 2θ range was from 10° to 80° at a scanning speed of 1.2°/min. Identification of the crystalline phases was performed by comparison with JCPDS files 09-0432 and 84-0654 for hydroxyapatite and wollastonite, respectively. For FT-IR absorption analysis, the samples in KBr pellets were analyzed in the transmission mode using a PerkinElmer Spectrum GX System FT-IR spectrometer (Boston, MA) over the range 4000 - 400 cm⁻¹.

Morphological studies of the samples were performed using a JEOL SEM 5300 scanning electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan). TEM studies of the samples were done on a JEOL JEM-2010F instrument. Sample specimens were prepared by dispersing the powders in distilled water to form very dilute suspensions. A drop of suspension was transferred onto a carbon mesh supported on a conventional copper microgrid.

3. Results and Discussion

3.1. Synthesis of Hydroxyapatite-Wollastonite Biocomposite Powders

Figure 2 shows the thermogravimetric analysis (TGA) combined with differential thermal analysis (DTA) for the dried gel of calcium nitrate and ammonium phosphate in water from room temperature to 1000°C. The dried gel trace displays a thermal transition in the temperature region 180°C - 350°C, which corresponds to a weight loss of about 40 percent by weight with an exothermic peak at about 280°C. This weight loss could be associated to the formation of hydroxyapatite in the early stages of crystallization. A further thermal process between 500°C and 700°C, corresponding to a negligible weight loss, and represented by an exothermic peak at about

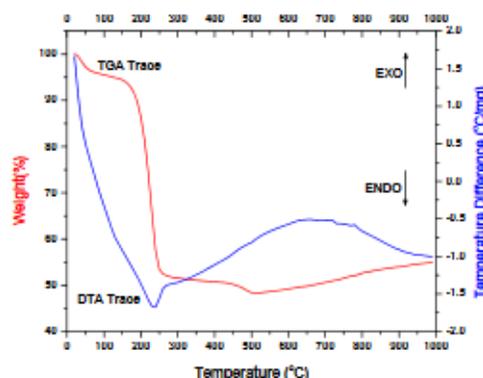


Figure 2. Thermogravimetric and differential thermal analysis trace for dried gel of calcium nitrate and ammonium phosphate in water from room temperature to 1000°C at a heating rate of 10°C/min.

650°C, could be due to formation of hydroxyapatite in advanced crystallization stages. **Figure 3** demonstrated that wollastonite does not exhibit any thermal transition in the whole temperature range. This fact indicates that synthesized hydroxyapatite and natural wollastonite added to produce the biocomposites, both maintain their chemical integrity, even under severe thermal conditions.

Figure 4 shows the XRD patterns for dried gel of calcium nitrate and ammonium phosphate in water upon heat treatment at 350°C and 750°C. This figure indicates that gel treated at 350°C is transformed to hydroxyapatite in an early crystallization stage; when gel was treated at 750°C it is converted to perfectly crystallized hydroxyapatite. In both cases the analysis reveals the presence of hydroxyapatite as individual phase in the materials.

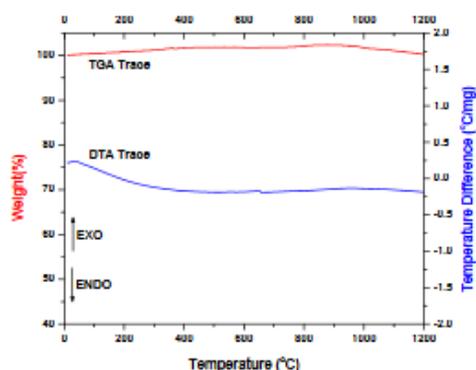


Figure 3. Thermogravimetric and differential thermal analysis trace for natural wollastonite from room temperature to 1200°C at a heating rate of 10°C/min.

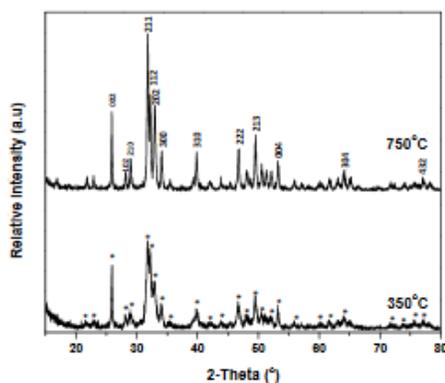


Figure 4. X-ray diffraction patterns for dried gel of calcium nitrate and ammonium phosphate in water upon heat treatment at 350°C and 750°C. (•) Hydroxyapatite.

For the above, hydroxyapatite in the biocomposites of this study, was synthesized at 750°C to obtain this bio-ceramic material completely crystallized.

Figure 5 shows the FT-IR spectra for the base materials. **Figure 5(a)** shows the spectral characteristics of natural wollastonite and **Figure 5(b)** shows the spectral characteristics of dried gel of calcium nitrate and ammonium phosphate in water upon heat treatment at 750°C, in the range of 4000 cm^{-1} to 400 cm^{-1} . The broad band around 1000 cm^{-1} in **Figure 5(a)** is mainly attributed to the silicate IR absorption of wollastonite. The peaks observed around 3571 cm^{-1} and 632 cm^{-1} in **Figure 5(b)** arise from the stretching and librational modes, respectively, of OH^- ions. The peaks at 1048 cm^{-1} and 1090 cm^{-1} have been associated with the stretching ν_3 mode of the P-O bonds, and the 962 cm^{-1} band arises from ν_1 symmetric P-O stretching vibrations mode of the PO_4^{3-} group. Bands at 603 cm^{-1} and 571 cm^{-1} were caused by the triply degenerate ν_4 bending vibration of the PO_4^{3-} group. The clear presence of two peaks at 603 cm^{-1} and 571 cm^{-1} , along the well-resolved peak at ~632 cm^{-1} confirms the presence of hydroxyapatite as stoichiometric phase [6,7,16-18].

Figure 6 resumes the X-ray diffraction patterns for natural wollastonite (100 W), and dried gels with different percentages by weight of wollastonite (20 H - 80 W) 80 wt%, (50 H - 50 W) 50 wt%, (80 H - 20 W) 20 wt% (100 H) 0 wt%, upon heat treatment at 750°C. This figure indicates that hydroxyapatite and wollastonite appear as unique phases in the biocomposites. In all cases well-crystallized, hydroxyapatite was obtained. This fact demonstrates that the wollastonite remains unreacted, throughout the whole in situ synthesis of hydroxyapatite.

Figure 7 shows the transmission electron micrographs of natural wollastonite and dried gels with different per-

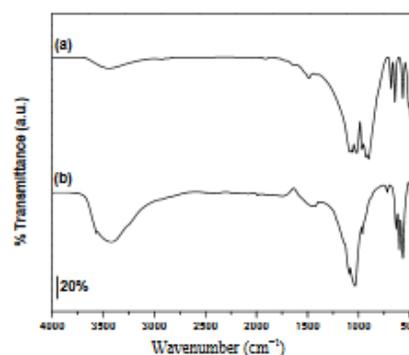


Figure 5. FT-IR spectra: (a) Natural wollastonite, (b) Dried gel of calcium nitrate and ammonium phosphate in water upon heat treatment at 750°C.

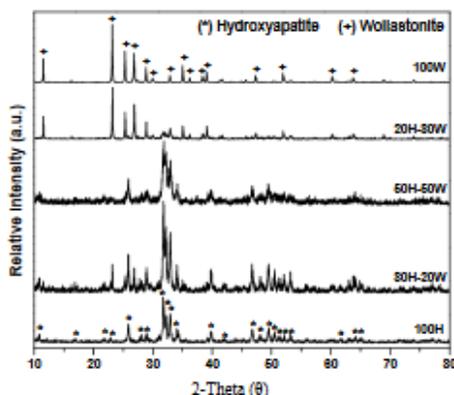


Figure 6. X-ray diffraction patterns for natural wollastonite (100 W), and gels of calcium nitrate, ammonium phosphate in water with different wt% of wollastonite upon heat treatment at 750°C: (20 H - 80 W) 80 wt%, (50 H - 50 W) 50 wt%, (80 H - 20 W) 20 wt% (100 H) 0 wt%. (*) Hydroxyapatite; (+) Wollastonite.

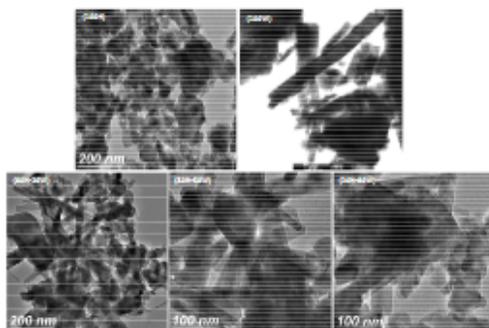


Figure 7. Transmission electron microscopic images of base materials powders: hydroxyapatite (100 H) and wollastonite (100 W), and hydroxyapatite-wollastonite biocomposites powders (80 H - 20 W, 50 H - 50 W, 20 H - 80 W).

centages by weight of wollastonite upon heat treatment at 750°C. This figure shows the typical lath shape and acicular (needle like) morphology of wollastonite fibers, while hydroxyapatite grains exhibit their typical shape and its hexagonal growth morphology [6]. Almost all of these grains are between 50 nm and 100 nm in size. In all biocomposites the grains of hydroxyapatite appear inserted among the wollastonite fibers, with the same shape and size than the observed in the base materials. The particles of synthesized hydroxyapatite agglomerate homogeneously on the surface of the wollastonite fibers, which assures an efficient interaction of both phases in the biocomposites. Additionally, the different amounts of wollastonite involved in the formation of the biocomposites

do not affect the stages of synthesis and the final characteristics, such as the structure and morphology of hydroxyapatite produced. These morphological characteristics of these biocomposites can avoid direct fiber-to-fiber interaction because the surfaces of wollastonite fibers are covered thoroughly by hydroxyapatite. Any further treatment such as pressing and sintering will produce materials with mostly fiber-hydroxyapatite interactions, because when the fibers interacted with themselves, other studies [12-14] have reported that these interactions affect some of the physical and mechanical properties of the materials.

3.2. Sintering of Hydroxyapatite-Wollastonite Biocomposites

Figures 8 and 9 show the scanning electron micrographs for cylindrical tablets of natural wollastonite (100 W), and synthesized hydroxyapatite (100 H), and biocomposites of hydroxyapatite-wollastonite with different percentages by weight of wollastonite (20 H - 80 W) 80 wt%, (50 H - 50 W) 50 wt%, (80 H - 20 W) 20 wt%, sintered at 1200°C for 5 h. When the powders were sintered, the surfaces in all materials show a compact microcrystalline appearance with clear crystal boundaries and some micropores. This fact demonstrates that the sintered hydroxyapatite-wollastonite biocomposites were not completely dense in the processing conditions of this study. Although it could be thought that this porosity could

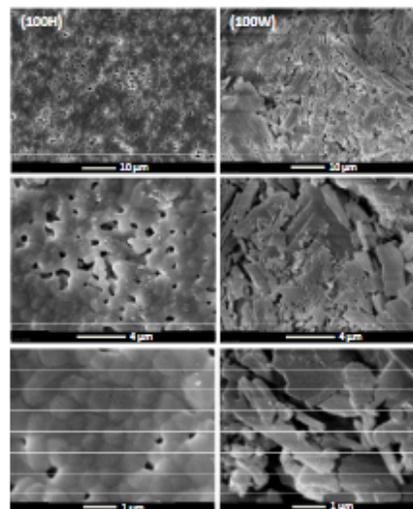


Figure 8. Scanning electron micrographs of sintered base materials: hydroxyapatite (100 H) and natural wollastonite (100 W) sintered at 1200°C for 5 h, at different magnifications.

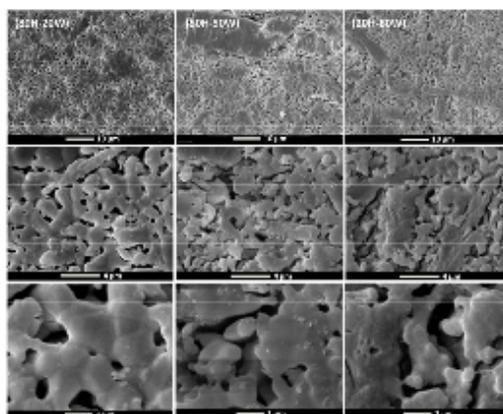


Figure 9. Scanning electron micrographs of sintered hydroxyapatite-wollastonite biocomposites (80 H - 20 W, 50 H - 50 W, 20 H - 80 W) sintered at 1200°C for 5 h, at different magnifications.

have a negative effect on the mechanical properties, the porosity actually enhances the bioactive properties, because the pores increase the penetration of physiological solutions in the specimens and permit the crystal growth of the bone-like apatite towards the surface, resulting in more efficient bioactive properties [7,19]. Therefore, the appropriate relationship between porosity and mechanical behavior in these materials has important implications in bone regeneration. Consequently, in a complementary study the porosity effect will be analyzed, and its relationship with the microstructure and mechanical properties of the materials will be evaluated.

4. Conclusion

Hydroxyapatite-wollastonite biocomposites were synthesized using an alternative sol-gel route using calcium nitrate and ammonium phosphate as hydroxyapatite precursors, and high purity natural wollastonite as reinforcement phase in aqueous medium. Formation of hydroxyapatite in the biocomposites occurs at the relatively low temperature of about 350°C, in the early stages of crystallization. A further thermal treatment of about 750°C produces completely crystallized hydroxyapatite, while wollastonite remains unreacted. The particles of hydroxyapatite appear agglomerated on the surface of wollastonite fibers. The hydroxyapatite-wollastonite biocomposite powders sintered at 1200°C for 5 h, experience no significant decomposition upon this heat treatment. The hydroxyapatite and wollastonite remain as single phases in the sintered biocomposites, exhibiting a certain grade of porosity. Although this porosity could have a negative effect on the mechanical properties, it is

important for ensuring the efficient integration of these materials with bony tissues, which could be modulated to vary the amounts of base materials in the biocomposites.

5. Acknowledgements

The authors are grateful to Francisco Brown Bojórquez and Victor Emmanuel Alvarez Montaño from DIPyM-UNISON, Israel Gradilla, Eloisa Aparicio, Jesús Antonio Díaz, David Domínguez, Eric Flores Aquino and Jaime Mendoza López from CNYN-UNAM for assistance in the characterization and discussions. This work was partially supported by PACAC UNISON-UNAM through project Px-864 and DGAPA-PAPIIT-UNAM through grant IN207511.

REFERENCES

- [1] L. L. Hench, "Bioceramics: From Concept to Clinic," *Journal of the American Ceramic Society*, Vol. 74, No. 7, 1991, pp. 1487-1510. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x>
- [2] R. Z. LeGeros, "Calcium Phosphate Materials in Restorative Dentistry: A Review," *Advances in Dental Research*, Vol. 2, No. 1, 1998, pp. 164-180.
- [3] R. Z. LeGeros and J. P. LeGeros, "Dense Hydroxyapatite," In: L. L. Hench and J. Wilson, Eds., *An Introduction to Bioceramics*, World Scientific, Singapore, 1993, pp. 139-180. http://dx.doi.org/10.1142/9789814317351_0009
- [4] R. Petit, "The Use of Hydroxyapatite in Orthopaedic Surgery: A Ten-Year Review," *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*, Vol. 9, No. 2, 1999, pp. 71-74. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01695730>
- [5] G. Bezzi, G. Celotti, E. Landi, T. M. G. La Torretta, I. Sopyan and A. Tampieri, "A Novel Sol-Gel Technique for Hydroxyapatite Preparation," *Materials Chemistry and Physics*, Vol. 78, No. 3, 2003, pp. 816-824. [http://dx.doi.org/10.1016/S0254-0584\(02\)00392-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0254-0584(02)00392-9)
- [6] M. A. Encinas-Romero, S. Aguayo-Salinas, S. J. Castillo, F. F. Castellón-Barraza and V. M. Castaño, "Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite-Wollastonite Composite Powders by Sol-Gel Processing," *International Journal of Applied Ceramic Technology*, Vol. 5, No. 4, 2008, pp. 401-411. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7402.2008.02212.x>
- [7] M. A. Encinas-Romero, S. Aguayo-Salinas, J. L. Valenzuela-García, S. R. Payán and F. F. Castellón-Barraza, "Mechanical and Bioactive Behavior of Hydroxyapatite-Wollastonite Sintered Composites," *International Journal of Applied Ceramic Technology*, Vol. 7, No. 2, 2010, pp. 164-167. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7402.2009.02377.x>
- [8] T. Kokubo, "A/W Glass-Ceramic: Processing and Properties," In: L. L. Hench and J. Wilson, Eds., *An Introduction to Bioceramics*, World Scientific, Singapore, 1993, pp. 75-88. http://dx.doi.org/10.1142/9789814317351_0005

- [9] M. J. Olszta, X. Cheng, S. S. Jee, R. Kumar, Y. Kim, M. J. Kaufman, E. Douglas and L. B. Gower, "Bone Structure and Formation: A New Perspective," *Materials Science and Engineering: R*, Vol. 58, No. 3, 2007, pp. 77-116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mser.2007.05.001>
- [10] T. Yamamuro, "A/W Glass-Ceramic: Clinical Applications," In: L. L. Hench and J. Wilson, Eds., *An Introduction to Bioceramics*, World Scientific, Singapore, 1993, pp. 89-103. http://dx.doi.org/10.1142/9789814317351_0006
- [11] S. M. Best, A. E. Porter, E. S. Thian and J. Huang, "Bioceramics: Past, Present and for the Future," *Journal of the European Ceramic Society*, Vol. 28, No. 7, 2008, pp. 1319-1327. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2007.12.001>
- [12] Y. E. Greish and P. W. Brown, "Characterization of Wollastonite-Reinforced Hap-Ca polycarboxylate Composites," *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 55, No. 4, 2001, pp. 618-628. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-4636\(20010615\)55:4<618::AID-JBM1056>3.0.CO;2-9](http://dx.doi.org/10.1002/1097-4636(20010615)55:4<618::AID-JBM1056>3.0.CO;2-9)
- [13] V. V. Shumkova, V. M. Pogrebenkov, A. V. Karlov, V. V. Kozik and V. I. Vereshchagin, "Hydroxyapatite-Wollastonite Bioceramics," *Glass Ceramic*, Vol. 57, No. 9-10, 2000, pp. 350-353. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1007198521974>
- [14] H.-S. Ryu, J. K. Lee, H. Kim and K. S. Hong, "New Type of Bioactive Materials: Hydroxyapatite/ α -Wollastonite Composites," *Journal of Materials Research*, Vol. 20, No. 5, 2005, pp. 1154-1162. <http://dx.doi.org/10.1557/JMR.2005.0144>
- [15] NYCO Minerals Inc., "Premium Quality Wollastonite NYAD M325," NYCO IN-299-04-01 Booklet, NYCO Minerals, Willsboro, 2001.
- [16] M. Markovic and B. O. Fowler, "Preparation and Comprehensive Characterization of a Calcium Hydroxyapatite Reference Material," *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, Vol. 109, No. 6, 2004, pp. 553-568. <http://dx.doi.org/10.6028/jres.109.042>
- [17] P. N. de Aza, F. Guitián and C. Santos, "Vibrational Properties of Calcium Phosphate Compounds. 2. Comparison between Hydroxyapatite and β -Tricalcium Phosphate," *Chemistry of Materials*, Vol. 9, No. 4, 1997, pp. 916-922. <http://dx.doi.org/10.1021/cm9604266>
- [18] C. Paluszkiwicz, M. Blazewicz, J. Podporska and T. Gumuła, "Nucleation of Hydroxyapatite Layer on Wollastonite Material Surface: FTIR Studies," *Vibrational Spectroscopy*, Vol. 48, No. 2, 2008, pp. 263-268. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vibspec.2008.02.020>
- [19] M. Kawata, H. Uchida, K. Itatani, I. Okada, S. Koda and M. Aizawa, "Development of Porous Ceramics with Well-Controlled Porosities and Pores Size from Apatite Fibers and their Evaluation," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 15, No. 7, 1998, pp. 817-823. <http://dx.doi.org/10.1023/B:JMSM.0000032823.66093.a>