



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROXIAPATITA POROSA A PARTIR DE CÁSCARA DE HUEVO Y TUNICINA

JORGE LUIS ALEJANDRO TORRES FUENTES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

PROFESOR GUÍA : JOSÉ LUIS ARIAS BAUTISTA

Financiamiento FONDECYT 1080185 y FONDAP 11980002

SANTIAGO, CHILE
2010



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
HIDROXIAPATITA POROSA A PARTIR DE
CÁSCARA DE HUEVO Y TUNICINA**

JORGE LUIS ALEJANDRO TORRES FUENTES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

NOTA FINAL:

NOTA FIRMA

PROFESOR GUÍA : JOSÉ LUIS ARIAS BAUTISTA

PROFESOR CONSEJERO: ANDRÓNICO NEIRA CARRILLO

PROFESOR CONSEJERO: MARCO GALLEGUILLOS CAAMAÑO

Financiamiento FONDECYT 1080185 y FONDAP 11980002

**SANTIAGO, CHILE
2010**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, dedico la tesis a mi familia, por ayudarme cada vez que lo necesité, a mi profesor guía José Luis Arias, así como también a los Dr. Ma. Soledad Fernández y Dr. Andrónico Neira, por brindarme su apoyo y paciencia en el proceso de realización de la tesis. A Cynthia Ortiz y Evelyn Albornoz, por enseñarme a utilizar el laboratorio y contenerme cuando los experimentos no daban buenos resultados y finalmente a mis amigos del laboratorio y la carrera, porque gracias a ellos, en parte, ha sido más grato todo el estudio. Quisiera dar también una especial mención, a la Dra. Valeria Rojas, por ser un gran apoyo en todas estas últimas etapas en la carrera.

ÍNDICE

Resumen	1
Summary	3
Introducción	5
Revisión Bibliográfica	8
El tejido óseo	8
Implantes óseos.	11
Materiales alternativos sintéticos: Biomateriales.	12
Material inorgánico: Hidroxiapatita.	14
Síntesis de hidroxiapatita.	15
Material orgánico: Celulosa	18
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
1. Fase de extracción y síntesis.	21
1.1 Extracción de Tunicina	21
1.2 Síntesis de HAp a partir de cáscaras de huevo.	22
1.3 Producción de un compósito de HAp y tunicina.	23
1.4 Obtención de HAp con porosidad controlada	23
2. Fase de caracterización	23
2.1 Análisis químico.	23
2.2 Análisis físico	24
2.3 Análisis morfológico	27
RESULTADOS	28

1. Análisis químico	28
1.1 Espectroscopía de rayos X o XRD	28
1.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier o FT-IR	33
2. Análisis físico	34
2.1 Análisis clásico volumétrico de adsorción:	34
2.2 Medición de la resistencia y deformación	35
3. Análisis morfológico	38
3.1 Microscopía electrónica de barrido o SEM.	38
DISCUSIÓN	48
Fase de extracción de tunicina.	48
Fase de síntesis de HAp.	50
Fase de producción de un compuesto de tunicina e HAp	51
Fase de obtención de HAp con porosidad controlada	51
BIBLIOGRAFÍA	55
ÍNDICE DE FIGURAS	59

RESUMEN

Los tejidos duros de animales y humanos contienen aproximadamente entre un 70 a un 90% de su peso total de una fase inorgánica conocida como apatita biológica. Los materiales sustitutos de hueso más destacados presentes hoy en día, corresponden a cerámicas de fosfato de calcio sintéticos en base a hidroxiapatita (HAp) o fosfato β -trícálcico, debido a que la composición química de estas cerámicas está muy relacionada con la del mineral óseo, lo que conduce a una buena biocompatibilidad en contacto con hueso. El objetivo de este trabajo fue la obtención de HAp porosa a partir de cáscaras de huevo y tunicina, una celulosa obtenida a partir de tunicados. La síntesis de HAp se realizó en solución con tunicina, carbonato de calcio y ácido fósfórico, respetando la relación estequiométrica Ca:P de 1,67. Tanto la tunicina como la HAp fueron caracterizadas mediante SEM y XRD. Por otra parte, la tunicina se extrajo mediante hidrólisis con ácido clorhídrico, siendo caracterizada como fibras individuales, flóculos y varillas fabricadas en seco y en medio líquido. El resultado obtenido de la síntesis fue prensado a 10.000 toneladas a fin de formar un compósito. La caracterización del compósito se realizó mediante SEM. Luego se calcinó a 1200 °C para producir HAp porosa. Se realizó SEM, XRD, FT-IR, mediciones del área BET y pruebas de resistencia mecánica y deformación. La caracterización mediante SEM y área BET arrojó un tamaño de poros adecuado para osteoconducción, superior a 200 μm , siendo el mínimo necesario 100 μm , las fibras de tunicina se caracterizaron individualmente, como varillas producidas tanto en agua como en seco mediante fricción, resultando el último método aquel que entrega tamaños de fibras más adecuados para la formación del compósito. Tanto los resultados del XRD presentaron los principales picos de la HAp (2θ : 11,59; 29,30) y FT-IR, en donde se encuentran las longitudes de onda típicas (3570 cm^{-1} para los grupos hidroxilos y 1090 cm^{-1} , 1043 cm^{-1} , 961 cm^{-1} , para los grupos fosfatos y carbonatos), avalan la formación de HAp a partir de la cáscara de huevo. No sólo la HAp y la tunicina fueron caracterizadas por XRD, también se realizó con muestras de cáscara de huevo y cáscara calcinada. Las mediciones de resistencia mecánica se realizaron a las distintas cerámicas de HAp porosas en las que se utilizó o no gelatina, con una concentración de 70 % HAp y 30 % tunicina u 80 % HAp y 20% tunicina, resultando diferencias entre los distintos tratamientos para la resistencia

(promedio para las muestras con gelatina arrojó una media de $439,5 \pm 237,85$ g, mientras que las muestras sin gelatina la media fue de $544 \pm 208,96$ g con un $CV = 38,456$, considerando la relación HAp/Tunicina, se desprende para el grupo 70/30 una media de $298,75 \pm 74,91$ g, mientras que para las muestras 80/20 la media es $684,75 \pm 50,77$ g siendo el valor de $p = <0,0001$), pero no para la deformación (promedio con gelatina de $0,36 \text{ mm} \pm 0,06$ y sin gelatina de $0,41 \pm 0,09$ mm; proporción de 70/30 de $0,37 \pm 0,05$ mm y proporción de 80/20 de $0,39 \pm 0,10$ mm siendo el valor de $p = 0,6633$). En tanto los ensayos con análisis volumétrico de adsorción o área BET (área superficial), no mostraron diferencias para los mismos tratamientos ($p = 0,8126$). Estos resultados comprueban la factibilidad de la síntesis, mediante tunicina e HAp, de una cerámica porosa que pueda ser utilizada como implante ya que cumple los requisitos mínimos de diámetro para osteoconducción y biocompatibilidad.

SUMMARY

Human and animal hard tissues contain from 70 to 90 weight % of an inorganic phase known as “biological apatite”. At the moment, the most prominent bone substitution materials are synthetic calcium phosphate ceramics based on of hydroxyapatite (HAp) or β -tricalcium phosphate because their chemical composition is close to that of bone mineral leading to a good biocompatibility. The purpose of the present work was to obtain porous HAp from hen eggshells and tunicin, a cellulose material obtained from tunicates. The HAp synthesis was realized in tunicin, calcium carbonate and phosphoric acid solution, aiming for a final Ca/P molar ratio of 1.67. Tunicin and HAp samples characterization was carried out by X-Ray Diffraction (XRD) and Scanning Electron Microscopy (SEM). On the other hand, tunicin was extracted by hydrolysis with HCl, and was characterized as individual fibers, suspension and rods made in dry or aqueous solution. The material obtained from the synthesis was pressed by 10000 tons in order to form a composite. The characterization of the composite was done by SEM. The composite was calcined at 1200 °C to produce porous HAp. SEM, XRD, FT-IR, measurements of area BET and tests of mechanical resistance and deformation were done. The characterization by SEM and area BET threw a size of suitable pores for osteoconduction, superior to 200 μm , being the necessary minimum 100 μm . The dried tunicin rods produced by friction had an optimum fiber diameter for composite production. Studies by X-ray diffraction have confirmed that HAp appeared (peaks 11,59; 29,30) and FTIR spectrum of HAp sample shows characteristic bands (3570 cm^{-1} (-OH groups) 1090 cm^{-1} , 1043 cm^{-1} , 961 cm^{-1} , for the phosphate and carbonate groups), demonstrating the formation of HAp from the eggshell. Not only the HAp and the tunicin were characterized by XRD, also it was done on samples of hen eggshell and calcined eggshell. The measurements of mechanical resistance were done to the different porous HAp ceramic in which non-gelatin or gelatin was used, with a concentration from 70 % HAp and 30 % Tunicin or 80 % HAp and 20 % Tunicin, showing differences between the different treatments for the resistance (gelatin samples threw a mean of $439 \pm 237,85$ g, whereas without gelatin samples, the means was of $544 \pm 208,96$ g with a CV = 38,456.

Considering the HAp/Tunicina relation, the mean of 70/30 groups was $298,75 \pm 74,91$ g, whereas for 80/20 samples, it was $684,75 \pm 50,77$ g being the value of $p = 0,0001$), but deformation did not show differences (means for gelatin group was $0,36 \pm 0,06$ mm and without gelatin of $0,41 \pm 0,09$ mm; 70/30 of $0,37 \pm 0,05$ mm and 80/20 of $0,39 \pm 0,10$ mm being the value of $p = 0,6633$). In as much, adsorption volumetric analysis or area BET did not show difference for the same treatments ($p = 0,8126$). These results verify the synthesis, by tunicin and HAp, of a porous ceramics that can be used as implants because it satisfies the diameter minimum requirements for osteoconduction and biocompatibility.

INTRODUCCIÓN

Los tejidos duros de animales y humanos contienen aproximadamente entre un 70 a un 90 % de su peso total de una fase inorgánica conocida como apatita biológica que es a menudo sustituida por carbonato, por lo que es más apropiado referirse a apatita carbonatada (Acevedo-Dávila *et al.*, 2007). Estos tejidos están sometidos a un gran estrés mecánico, por lo que las fracturas y las injurias en los huesos son un problema de salud serio y frecuente en la práctica clínica diaria.

Los biomateriales más comunes utilizados como sustitutos de hueso son autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos y varios biomateriales como polímeros, metales, compósitos y biocerámicas. Sin embargo, ninguno de estos materiales provee una solución perfecta a la regeneración del hueso debido a que aún existen interrogantes sobre su estabilidad mecánica, biocompatibilidad *in vivo* a largo plazo y biodegradabilidad (Tadic *et al.*, 2004). La necesidad de poseer nuevas alternativas cuyas propiedades sean mejoradas está presente. Tanto las técnicas quirúrgicas como el conocimiento médico continuamente avanza y existe una mayor demanda de materiales óseos de reemplazo, esto principalmente debido a que los autoinjertos son limitados y su uso implica un gran riesgo (Hing *et al.*, 1999).

Los materiales sustitutos de hueso más destacados presentes hoy en día, corresponden a cerámicas de fosfato de calcio sintéticos en base a hidroxiapatita (HAp) o fosfato β -tricálcico. Su composición química está relacionada con la del mineral óseo, lo que conduce a una buena biocompatibilidad en contacto con hueso (Tadic *et al.*, 2004). No obstante, la mayor diferencia entre la HAp sintética y el mineral del hueso es la alta cristalinidad y la ausencia de carbonato en la primera. Esto conlleva a una biodegradación mucho menor comparada con los nanocristales del mineral óseo (Tadic *et al.*, 2004). Una de las ventajas de la HAp sintética es la formación de una unión química con el hueso hospedero, y por esta razón es ampliamente utilizada en aplicaciones médicas como implantes, prótesis o como relleno de hueso (Prabakaran *et al.*, 2005).

Recientemente, un gran interés se ha generado sobre la síntesis de biocerámicas con una morfología porosa que permita el crecimiento interno del tejido óseo, mejorando la

fijación mecánica del implante al sitio de implantación. Si una cerámica porosa implantada es progresivamente reemplazada por hueso natural, sus propiedades biomecánicas se asemejan cada vez más al tejido óseo natural (Tadic *et al.*, 2004). Consecuentemente, existe un interés creciente en el desarrollo de material de reemplazo óseo de HAp sintética porosa motivado principalmente por el potencial de restauración de vascularidad y la completa penetración del tejido óseo en el sitio de reparación (Hing *et al.*, 1999).

Las cáscaras de huevo, que constituyen entre un 9 a un 12 % del total del peso de los huevos domésticos, son una potencial fuente natural de carbonato de calcio (CaCO_3) que podría ser utilizado en la síntesis de HAp carbonatada (Acevedo-Dávila *et al.*, 2007). Las cáscaras de huevo son consideradas generalmente como un desecho, aunque poseen algunos usos como fertilizantes o para la producción de variados suplementos nutricionales para humanos y animales, fundamentalmente basados en su alto contenido de calcio y nitrógeno. Actualmente, cáscaras de huevo pulverizadas han sido evaluadas en el área biomédica como material de relleno para defectos craneales en ratas (Acevedo-Dávila *et al.*, 2007).

Varios estudios avalan la posibilidad de sintetizar HAp a partir de cáscaras de huevo. Tanto síntesis mediante tratamientos térmicos (Rivera-Muñoz *et al.*, 2003), como químicos (Prabakaran *et al.*, 2005, Acevedo-Dávila *et al.*, 2007) han tenido resultados exitosos. Sin embargo, ninguno de estos estudios ha sintetizado HAp porosa a partir de la cáscara de huevo.

La importancia de los poros, en los implantes cerámicos ha sido documentada con anterioridad (Hing *et al.*, 1999). Se requiere una conectividad y tamaño mínimo de poros para el crecimiento de vasos sanguíneos al interior del implante, fenómeno conocido como osteoconducción (Tadic *et al.*, 2004).

Para introducir porosidad a un objeto cerámico se han desarrollado varios métodos como la incorporación de un polímero orgánico que posteriormente es eliminado por calor, que crea un sistema poroso interconectado (Tadic *et al.*, 2004).

Polímeros orgánicos naturales existen en abundancia en la naturaleza siendo la celulosa el más abundante en la Tierra. Es sabido desde hace bastantes años que la hidrólisis de celulosa con altas concentraciones de ácido clorhídrico (HCl) o ácido sulfúrico (H_2SO_4) induce una rápida disminución en el largo de cadenas de este polímero (Tsuchiya

y Susuki, 1962), y que cercana a la hidrólisis terminal se obtienen barbas de celulosa que varían el largo de simples nanómetros, como la madera y el algodón, a varios micrómetros como la tunicina o la celulosa de Valonia (Habibi *et al.*, 2006).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El tejido principal del sistema esquelético es el hueso, el cual corresponde a un soporte importante en la gran mayoría de vertebrados superiores. El hueso corresponde a un compuesto cerámico formado en su mayoría por colágeno e HAp. La disposición laminillar y la matriz fibrilar limitan tanto el daño por fatiga como el crecimiento de fracturas, así como también, mediante la remodelación por parte de las células se reparan estos daños y continuamente se adapta a los cambios producidos por el estrés mecánico. Cuando un hueso sufre un trauma, como un daño físico o quirúrgico, se requiere de un soporte mecánico para facilitar de la regeneración ósea. Habitualmente, el soporte mecánico utilizado corresponde a un implante de hueso, aunque últimamente, los biomateriales están ganando una alta popularidad como sustitutos de hueso. Los biomateriales forman una fuerte unión con los tejidos vivos, tanto con el hueso como con los tejidos conectivos y poseen características mecánicas semejantes al hueso, es por esto que los implantes de biomateriales proveen un mejor medio para asistir al proceso de reparación (Bandyopadhyay-Gosh, 2008).

El tejido óseo

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conectivo mineralizado muy vascularizado e innervado que está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006) proporcionando al hueso de resistencia, soporte y protección (Verde-Carvallo *et al.*, 2004). Desde el punto de vista de la ingeniería de tejidos, el hueso corresponde a un material multilaminar formado de varios tipos de componentes orgánicos como osteoblastos, osteoclastos y colágeno, y varias sustancias inorgánicas como fósforo, calcio, sodio, potasio, magnesio, manganeso y flúor (Jensen *et al.*, 2007).

En el hueso coexisten varios tipos de células que se hallan dentro del propio tejido óseo o en el estroma conjuntivo de la médula ósea, rico en células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas. Desde hace mucho tiempo, se conoce que estas células mesenquimales pueden dar origen a cinco estirpes celulares distintas: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y miofibroblastos, en respuesta a diferentes señales

moleculares que inician la cascada de activación de diferentes genes (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006). Los osteoblastos son células grandes (20-30 μm) de forma poliédrica que emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz comunicándose con la red de osteocitos y osteoblastos vecinos, y que proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares, Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3 μm por día y expresan una enzima característica, la fosfatasa alcalina, que permite la mineralización del hueso a un ritmo de 1 a 2 μm por día (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006). Actualmente se sabe que:

1. Sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso.
2. Dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular.
3. Contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la fosfatasa alcalina.
4. Participan en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas.
5. Sintetizan factores de crecimiento.

Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro de ella transformándose en osteocitos. Los osteocitos son las células más abundantes del hueso, poseen forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas u osteoplastos y los procesos citoplasmáticos se comunican entre sí a través de los conductos calcóforos que están llenos de fluido óseo extracelular. Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se estima que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción. Las células encargadas de la reabsorción son los osteoclastos. Se trata de células grandes (100 μm), multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas que presentan dos especializaciones en la membrana plasmática: un borde en cepillo, que es donde tiene lugar la reabsorción y una zona clara, rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje a la matriz (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006).

La matriz orgánica o sustancia osteoide representa un tercio del peso total del hueso. El colágeno, que corresponde al 90 % del material orgánico de la matriz ósea, está clasificado en varios tipos diferentes, siendo el colágeno de tipo I sintetizado por osteoblastos aquel que representa el 95 % del colágeno total, mientras que el 5 % restante corresponde a colágeno de tipo V, colágeno de tipo III y en menor medida colágeno de tipo XII (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006). El colágeno puede ser encontrado a intervalos regulares creando una serie de bandas o estriaciones en la matriz del hueso sufriendo un proceso de calcificación y endurecimiento, al contrario de lo que ocurre con el colágeno que se encuentra en la piel o los tendones. Este proceso de calcificación es el resultante de la interacción de las fibras de colágeno con los cristales de HAp en la matriz extracelular del hueso (Jensen *et al.*, 2007).

El componente inorgánico del hueso corresponde al mayor componente de la matriz ósea, siendo aproximadamente el 65% (Rivera-Muñoz *et al.*, 2003). En su mayoría, el componente inorgánico corresponde a HAp, representando cerca del 50 % del peso total del hueso. La HAp se encuentra depositada en forma de cristales, que aparecen de forma semejante a espigas, con tres capas. La capa más interna, denominada capa cristal interior, la capa media, conocida como superficie del cristal y la capa más externa, llamada cáscara de hidratación. Los cristales de HAp miden cerca de 150 nm de largo, y 1,5 a 7,5 nm de ancho y se encuentran distribuidos en intervalos específicos alrededor de las fibras de colágeno (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006). La HAp, sin embargo, posee varias sustituciones de Ca por K, Mg, Sr, Na y carbonato por fosfato o hidroxilos (Bandyopadhyay-Gosh, 2008). Los iones carbonato sustituyen primariamente los grupos fosfatos de la apatita biológica, lo que se designa como sustitución tipo B. Sin embargo, los grupos hidroxilos (OH) pueden ser también sustituidos, lo que se conoce como sustitución de tipo A, por lo que es más apropiado referirse a ella como HAp carbonatada (Acevedo-Dávila *et al.*, 2007). Muchas de estas sustituciones juegan roles significativos en las propiedades estructurales y mecánicas del mineral del hueso. Análisis de razón estequiométrica Ca:P bordean los 1,3 - 1, en parte debido a la contribución del fosfato orgánico de la matriz (Bandyopadhyay-Gosh, 2008). La razón estequiométrica Ca:P de la HAp, por otra parte, corresponde a 1,67 (Acevedo-Dávila *et al.*, 2007). En adición a la

HAp, el hueso contiene grandes cantidades de carbonato, citrato de sodio y magnesio. Como elementos traza se encuentran hierro, zinc y cobre (Jensen *et al.*, 2007).

La formación del hueso comienza con un sustrato o la matriz extracelular antes descrita. Una vez que la matriz extracelular está en su lugar, los cristales de HAp se comienzan a acumular en el sitio de formación ósea, en concordancia con las bandas generadas por las fibrillas de colágeno, y en lugares específicos de la molécula. La deposición mineral de HAp en el sustrato orgánico da lugar a la calcificación y la generación de hueso propiamente tal. El proceso de calcificación, o la generación del nuevo hueso, no es uniforme, en el sentido de que este proceso de síntesis no ocurre a una tasa constante. La inconsistencia entre la tasa fijación de la matriz y el proceso de calcificación se debe principalmente a una carencia de minerales. Esta inconsistencia es más pronunciada especialmente durante la reparación ósea en una fractura. A pesar de esta inconsistencia, el proceso de calcificación en una fractura ocurre muy rápidamente hasta lograr una mineralización entre el 70 a 80 %, en cuyo punto, el proceso se retrasa. El término está dado porque los minerales ya no son capaces de penetrar entre los poros de los cristales de HAp y la matriz de fibrillas de colágeno (Jensen *et al.*, 2007).

Implantes óseos.

Los implantes óseos se muestran como las alternativas más utilizadas para la facilitación de la regeneración ósea cuando los cabos son imposibles de fijar. Un implante de hueso ideal debe ser económico, de fácil obtención y fabricación, bastante fuerte, poseer características osteogénicas, osteoinductivas y osteoconductoras (Agarwala y Bhagwat, 2005).

Como primera clasificación los sustitutos de hueso pueden ser divididos, según estas propiedades en:

1. Sustitutos que proveen un soporte para la osteoconducción o agentes osteoconductoras.
2. Sustitutos que inducen la diferenciación de células madre o agentes osteoinductivos

3. Sustitutos que proveen células madres o aspirados de médula osea o agentes osteogénicos.
4. Varias combinaciones entre agentes (Agarwala y Bhagwat, 2005).

El implante de hueso autógeno (obtenido del mismo individuo) es conocido como el sustituto óseo estándar ya que provee de los tres elementos necesarios para la generación y mantención del hueso: soporte para la osteoconducción, factores de crecimiento para la osteoinducción y células progenitoras para la osteogénesis, sin embargo este implante requiere de un sitio de obtención en otro hueso provocando un daño inherente (Agarwala y Bhagwat, 2005).

El implante de hueso alogénico es un método que reemplaza el tejido óseo dañado con tejido óseo obtenido desde otro individuo de la misma especie. Este tipo de implante no posee tantas limitaciones en la disponibilidad como los implantes autógenos, pero en la práctica son raramente utilizados por poseer un alto riesgo de transmisión de enfermedades y causar una respuesta inmune desfavorable (Agarwala y Bhagwat, 2005).

Otro tipo de implante de hueso es la transferencia de tejido desde otra especie de mamífero o xenoimplante. El más típico corresponde a hueso bovino. Este tipo de implante al igual que los alogénicos es generalmente asociado a potenciales infecciones, pero es menos efectivo sin un buen tratamiento antigénico (Agarwala y Bhagwat, 2005).

Materiales alternativos sintéticos: Biomateriales.

La investigación actual se centra en materiales que puedan ser utilizados como reemplazo de hueso. Los materiales para implantes pueden ser subdivididos dentro de tres clases generales: biotolerantes, bioactivos y biodegradables; basados en su nivel de interacción con el tejido conectivo y el tipo de respuesta celular involucrada (Kieswetter *et al.*, 1996). La formación de cápsulas de tejido conectivo alrededor de los implantes que no se adhiere es generalmente característico de los materiales biotolerantes. Algunos materiales con una leve formación de cápsulas delgadas de tejido conectivo a menudo son mal llamados “bioinertes” debido a que una respuesta inflamatoria crónica severa no es evidente (Kieswetter *et al.*, 1996). Aquellos materiales interactúan con el tejido

circundante, pero no al grado de provocar cambios en la estructura celular al microscopio de luz. De hecho, la presencia de tejido conectivo en la interfaz, demuestra que estos materiales provocan una respuesta biológica que lleva a las células a sintetizar, secretar y mantener el ambiente del tejido conectivo normal. Algunos de estos materiales son de uso actual como los polímeros de politetrafluoroetileno (PTFE) y polimetilmetacrilato (PMMA), cerámicas como la alúmina y zirconia, y metales como el titanio y aleaciones de cobalto-cromo-molibdeno (Kieswetter *et al.*, 1996).

Los materiales bioactivos abarcan otra categoría general de materiales usados en hueso *in vivo*. Las superficies de estos materiales se diseñan para interactuar con el tejido conectivo que lo rodea a fin inducir la formación de hueso en directo contacto con el implante. Idealmente, estos materiales son usados para unir huesos y formar una unión entre el biomaterial y la matriz extracelular de las células del hueso adyacente. En algunos casos, sólo una aposición o interdigitación firme ocurre en este tipo de anclaje. La incorporación efectiva, y por lo tanto, una fijación rígida de un material externo dentro del hueso se conoce como osteointegración o oseointegración (Kieswetter *et al.*, 1996).

Los materiales bioactivos pueden ser derivados del tejido natural, como es la HAp natural tratada, o enteramente artificiales como las biocerámicas y fosfatos de calcio sintéticos, incluyendo a la HAp (Kieswetter *et al.*, 1996).

Los materiales biodegradables se diseñan para ser reemplazados finalmente por el propio tejido. Muchos de estos materiales son compuestos de agentes biológicos por ejemplo células, extractos de tejido, proteínas y un sistema de refuerzo. Idealmente el material reabsorbido no debería dejar rastros. Estos materiales, por lo tanto se limitan generalmente a las composiciones que pueden ser metabolizados fácilmente por el cuerpo, como por ejemplo productos derivados del colágeno, ácido poliláctico y polímeros de ácidos poliglicólicos. También se consideran injertos procesados de hueso (Kieswetter *et al.*, 1996).

Material inorgánico: Hidroxiapatita.

La HAp es una molécula cristalina esencialmente compuesta por fósforo y calcio $\text{Ca}_{10}(\text{HPO}_4)_6\text{OH}_2$. Esta constituye cerca del 65 % de la fracción mineral del hueso (Petit, 1999). La HAp es capaz de integrarse biológicamente en el tejido óseo y no producir una respuesta inmune, no es tóxica y posee una conducta osteoconductiva (Komlev *et al.*, 2001).

El gran desarrollo de la ingeniería de tejidos y la creciente necesidad de sustitutos óseos, explican la cantidad de esfuerzos destinados a la preparación, caracterización y el estudio de la HAp bajo diferentes condiciones fisicoquímicas, clínicas y sobre diferentes tipos de sustratos (Rivera-Muñoz *et al.*, 2003). El polvo de HAp ha sido utilizado en cirugías desde el año 1920 con el objetivo de promover la consolidación del hueso en aplicaciones ortopédicas, dentales y maxilofaciales (Petit, 1999).

Entre la familia de los fosfatos cálcicos, sólo la HAp y el fosfato dibásico cálcico (DCP) son químicamente estables a la temperatura y el pH fisiológico (37 °C y un pH alrededor de 7). El fosfato tricálcico (β -TCP) muestra una estabilidad química a altas temperaturas, pero se transforma en HAp a la temperatura del cuerpo humano en contacto con agua (Rivera-Muñoz *et al.*, 2003).

La HAp difiere de la apatita biológica en su estequiometría, composición química y cristalinidad, así como otras propiedades físicas, químicas y mecánicas. La ocurrencia de sustituciones por carbonato tipo A y B es muy frecuente en la HAp, alterando su estructura y propiedades. Cuando las sustituciones se llevan a cabo, la HAp es comúnmente conocida como HAp carbonatada (CHAp). La estabilidad térmica de la HAp es cercana a los 1000 °C. La incorporación de grupos carbonato en la estructura de la HAp provoca un aumento en su reactividad, permitiendo una rápida disolución en medios ácidos y una menor estabilidad térmica, levemente superior a los 500 °C. Esta sustitución es considerada una manera potencial de incrementar la similitud de este material con respecto a la apatita biológica incrementando su bioactividad y biocompatibilidad (Acevedo-Dávila *et al.*, 2007).

La HAp puede ser utilizada en forma de polvo, bloques porosos o gránulos para rellenar los defectos óseos o espacios que se pueden generar cuando grandes secciones de hueso han sido removidas, como por ejemplo en cáncer óseo o reconstrucciones maxilofaciales (Martinetti *et al.*, 2005).

Síntesis de hidroxiapatita.

Existen diferentes protocolos para sintetizar HAp, métodos como síntesis en estado sólido a altas temperaturas, hidrotermales, crecimientos a partir de cubiertas de sales, crecimiento en gel, hidrólisis de fosfato de calcio, pirólisis, secado en frío, secado en calor, y deposición electroquímica (Prabakaran *et al.*, 2005). Reacciones en estado sólido a altas temperaturas han sido utilizadas para mejorar el procesamiento de polvos de cerámica y el estudio de fase. Estos métodos por calor involucran la precipitación desde soluciones acuosas, reacciones ácido-base, hidrólisis, etc. En los métodos hidrotermales, la condición para la síntesis consiste en la aplicación de alta temperatura y presión a soluciones acuosas para inducir la precipitación de apatitas cristalizadas. El crecimiento en gel es inducido en un sistema acuoso que contiene iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} a una temperatura y pH cercana al fisiológico (Rivera-Muñoz *et al.*, 2003).

Varios estudios han propuesto la utilización de la cáscara de huevo como fuente de calcio en la preparación de HAp (Rivera-Muñoz *et al.*, 2003; Prabakaran *et al.*, 2005; Acevedo *et al.*, 2007). El uso de este residuo industrial representa una potencial disminución en los costos de manufactura de biomateriales con la ventaja adicional del reciclaje, ayudando a la reducción de contaminación por residuos (Rivera *et al.*, 2003). Químicamente, las cáscaras de huevo están formadas por carbonato de calcio (94%), carbonato de magnesio (1%), fosfato de calcio (1%), trazas de otros minerales y aproximadamente un 4% de materia orgánica y pigmentos (Thapon y Bourgeois, 1994).

El estudio de Rivera-Muñoz *et al.* (2003), ha reportado la síntesis de HAp siendo el precursor la cáscara de huevo, mediante la transformación del CaCO_3 en óxido de calcio (CaO) que es sometido a una reacción con hidrógeno fosfato de calcio (CaHPO_4) a 1100 °C utilizando gradientes de temperatura. En este estudio los productos obtenidos fueron HAp, Whitlockita y CaO, cuyas concentraciones eran muy dependientes de la gradiente de

temperatura empleada y cuya porosidad estaba presente pero era insuficiente para permitir osteoconducción. La desventaja de este método es la producción por medio de muy altas temperaturas, lo que incrementa los costos considerablemente en la generación de biomateriales, así como la síntesis de otros productos distintos a HAp. Prabakaran *et al.* (2003), por su parte, sintetizaron HAp mediante la aplicación de una solución 0,6 M de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) a una solución acuosa de polvo de cáscara de huevo manteniendo una relación Ca:P de 1,67 para luego calcinar el precipitado a temperaturas superiores a 900°C por dos horas. La relación estequiométrica de Ca:P de 1,67 es la indicada para la formación de HAp pura (Prabakaran *et al.*, 2003, Acevedo-Dávila *et al.*, 2007). Los resultados fueron exitosos, pero el procesamiento calórico eliminó la mayor cantidad de iones CO_3^{2-} propios de las apatitas carbonatadas, haciendo la biocerámica menos biocompatible.

Un especial interés se ha puesto a la generación de apatitas precipitadas en soluciones acuosas debido a la natural sustitución de tipo B por carbonato. Cuando la HAp es precipitada cerca de los $37\text{-}60^\circ\text{C}$ está pobremente cristalizada y se asemeja más a las apatitas naturales que a las apatitas sintéticas preparadas a $900\text{-}1000^\circ\text{C}$, debido a que los precipitados con bajo contenido de carbonato tienden a generar cristales en forma de espinas (Acevedo-Dávila *et al.*, 2007). Acevedo-Dávila *et al.* (2007), a diferencia de los otros estudios, buscó sintetizar CHAp a partir de la cáscara de huevo utilizando 3 métodos químicos a baja temperatura. En el método 1 se utilizó una solución de H_3PO_4 sobre el polvo de CaCO_3 mientras que los dos métodos restantes involucraron la generación previa de acetato de calcio ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) con la aplicación de ácido acético ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) para posteriormente aplicar soluciones acuosas de dodecahidrato fosfato de sodio tribásico ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) para el método 2 y una solución de fosfato de amonio dibásico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) en el método 3. En los tres casos se obtuvieron partículas finas de CHAp más una solución residual acuosa. En todos los casos, la solución fue estimada para una relación molar de Ca:P de 1,67 y llevada a cabo a temperatura ambiente. La caracterización demostró que el contenido de carbonato era mayor en el método 1, seguido del método 2 y 3 en comparación con un hueso bovino, por lo que la síntesis a través del método 1 produce un material más parecido al hueso, en términos de carbonato. Esto se debe principalmente a la alta afinidad que posee la solución de H_3PO_4 de captar moléculas de CO_2 ambientales.

Pero no basta solamente con producir CHAp si ésta posee poca porosidad. Un número considerable de estudios han buscado investigar tanto *in vivo* como *in vitro*, la respuesta de HAp porosa y densa (Hing *et al.*, 1999). La morfología de implantes cerámicos ha sido considerada desde hace mucho tiempo atrás. Discos porosos de una cerámica inerte exhiben una menor encapsulación fibrosa con una rápida reparación del músculo y tejido conectivo comparado con discos densos de la misma composición implantados en el mismo sitio (Hing *et al.*, 1999). La importancia de los poros con un diámetro y conectividad se debe principalmente a que la presencia de un tamaño de poros superior a 100-150 μm es un requisito fundamental para la osteoconducción (Tadic *et al.*, 2004), sin embargo dentro de estas dos características parece ser más crítica la conectividad (Hing *et al.*, 1999).

Para introducir porosidad a una cerámica se han desarrollado varios métodos, como la utilización de una sal soluble que deja poros al ser removida con agua y que usualmente genera porosidad no conectada o que están conectados por pequeños canales de escaso diámetro que no permiten la osteoconducción (Tadic *et al.*, 2004); o la incorporación de un polímero orgánico que se elimina mediante sinterización, creando un sistema poroso interconectado, sin embargo, requiere de un tratamiento de muy altas temperaturas, aumentando los costos y cambiando la cristalinidad de la HAp, lo que conlleva a una baja tasa de biodegradación (Tadic *et al.*, 2004). Diversos métodos se han reportado, como la impregnación de esponjas de celulosa con HAp, seguidos por calcinaciones a 1250-1280 $^{\circ}\text{C}$, o a partir de mezclas de HAp con polvo de polivinilbutirato o metilcelulosa seguidas de sinterizaciones a 1350 $^{\circ}\text{C}$ (Tadic *et al.*, 2004). Tadic *et al.* (2004), desarrollaron un método que consiste en la mezcla de cristales de sal y fibras de polímeros solubles en agua polivinilalcohol (PVA) con fosfato de calcio, seguidos por la aplicación de presión fría isoestática. Como estos porógenos son fácilmente solubles en agua pueden ser removidos sin necesidad de aplicar calor. La aplicación de sal aumenta el tamaño de poros, y la aplicación de PVA genera la conectividad, para poseer una adecuada conectividad se debe incrementar la cantidad de sal y de fibras de PVA lo que va en desmedro de las propiedades mecánicas de la cerámica.

La estabilidad mecánica disminuye al aumentar la porosidad, disminuyendo considerablemente entre 1/10 a 1/20 su fuerza compresiva, lo que favorece la propagación de fracturas (Tadic *et al.*, 2004). Es necesario, por lo tanto, conseguir porosidad interconectada sin recurrir al uso de sales que reduce la resistencia mecánica de la biocerámica.

Material orgánico: Celulosa

Polímeros orgánicos existen en abundancia en la naturaleza. La celulosa es un polímero natural considerado el más abundante en la Tierra, siendo el mayor constituyente en las plantas y está presente también en bacterias, hongos, algas y animales (O'Sullivan, 1996). Se estima que sólo por fotosíntesis, 10^{11} a 10^{12} toneladas de celulosa son sintetizadas anualmente (Klemm *et al.*, 2004). Como homopolisacárido, la celulosa está compuesta de β -D-glucopiranosas unidas por enlaces 1,4 β -glucosídicos (O'Sullivan, 1996). Es conocido que la hidrólisis de celulosa nativa con altas concentraciones de HCl o H₂SO₄ induce una rápida disminución en el largo de cadenas de la celulosa (Tsuchiya y Susuki, 1962).

Cercana a la hidrólisis terminal se obtienen microfibrillas de celulosa longitudinales de tamaños moleculares pequeños, comúnmente llamadas "barbas de celulosa". Estas barbas tienen el mismo diámetro que la microfibrilla inicial, pero sus largos varían de simples nanómetros a varios micrómetros (Habibi *et al.*, 2006). La descripción de las propiedades de las barbas de celulosa han sido el interés de variados estudios, en especial a los aspectos fundamentales estructurales o sus potenciales utilidades (Habibi *et al.*, 2006). En vista de sus pequeños tamaños, estas barbas necesitan ser manejadas en suspensiones acuosas o con solventes orgánicos. Si una barba de celulosa es preparada en una hidrólisis en HCl, su dispersabilidad es limitada y la solución tiende a generar flóculos. Por otra parte, cuando es H₂SO₄ el agente hidrolizante, este interactúa con los grupos hidroxilos de la celulosa dejándola cargada, promoviendo su solubilidad en agua (Habibi *et al.*, 2006). Varios autores confirman que las celulosas extraídas por hidrólisis de bacterias, *Valonia*, o de animales (*Tunicina*) poseen un mayor largo, 1 o más micrones, y un mayor diámetro comparadas con fibras obtenidas de algodón, madera u otras fuentes (Elazzouzi-Hafraoui *et al.*, 2008)

Distintos métodos de hidrólisis de la tunicina han sido propuestos. Tsuchiya y Susuki (1962), aplicaron HCl altamente concentrado por 24 horas obteniendo hidrólisis total de las fibras, determinando que correspondía a un polímero de glucosa unida mediante enlaces 1,4 β -glucosídicos. A medida que se disminuía la concentración del ácido y el tiempo de aplicación era posible obtener celobiosa, celotriosa, celotetrosa y celopentosas. En tanto, Habibi *et al.* (2006), sometiendo túnicas de ascídeas a un blanqueado y una hidrólisis con HCl 2,5N obtuvieron fibras con diámetros desde los 20 nm hasta el micrón de largo. Al hidrolizar algodón, a más altas temperaturas se obtiene una hidrólisis más rápida, modificando el diámetro y longitud, los que cambian linealmente al modificar la temperatura a valores menores (Elazzouzi-Hafraoui *et al.*, 2008). Este diámetro es aún insuficiente para la generación de porosidades en biocerámicas pero permite suponer que al reducir la concentración del ácido, el tiempo de exposición o la temperatura de la reacción, las microfibrillas sean cada vez de mayor diámetro y longitud.

HIPÓTESIS

Si es posible extraer partículas de tunicina de *Pyura chilensis* de tamaños controlados, entonces al unir hidroxiapatita y tunicina en proporciones definidas, se podrá obtener hidroxiapatita de porosidad controlada.

OBJETIVO GENERAL

Sintetizar HAp con distintos grados de porosidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obtener y caracterizar:

1. Tunicina a partir de la túnica de *Pyura chilensis*.
2. HAp a partir de la cáscara de huevo.
3. Un compósito de tunicina con HAp.
4. HAp con porosidad controlada.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Fase de extracción y síntesis.

1.1 Extracción de Tunicina

Para la extracción de barbas de tunicina se utilizaron mantos o túnicas de la ascídea *Pyura chilensis* (Molina, 1782). Inicialmente, las túnicas se trataron con hidróxido de potasio (KOH 5 %) (Merck®) por 18 horas seguido de 3 lavados con agua desionizada. Posteriormente, fueron fragmentadas en tamaños no superiores a 1 cm² y limpiadas mediante fricción a fin de eliminar restos orgánicos impropios a la túnica. Las túnicas fragmentadas se sometieron a 3 blanqueados que consistieron en exponer a las estructuras por 1 hora a 80-90 °C por medio de un agitador magnético y calefactor (Heildoph®) en una solución que contiene por cada gramo de túnica, 7,7 ml de H₂O, 0,3 ml de clorito de sodio (NaClO₂ 25 %) (Merck®) y 0,5 gotas CH₃CO₂H (Merck®) (Wise *et al.*, 1946). Las túnicas blanqueadas fueron desintegradas mediante una batidora de inmersión SB (Black&Decker®) operada a máxima velocidad durante 40 minutos y se secaron a 45 °C en una estufa (Science Teaching Incubator, Lab-line instruments Incs®).

Cada gramo de las túnicas blanqueadas se sometió a una hidrólisis ácida con 500 ml de HCl (Merck®) a diferentes concentraciones (0,5 N; 1 N; 1,5 N; 2,0 N y 2,5 N) en agitación constante a 90 °C por 50 minutos. El producto obtenido por cada hidrólisis se filtró al vacío y se lavó con H₂O desionizada. Finalmente, las túnicas fueron desintegradas totalmente por medio de un homogeneizador (OMNI® TH220 International) operado a máxima velocidad por 3 minutos.

1.1.1 Producción de varillas de tunicina en agua

Un ml de la solución de tunicina obtenida mediante la hidrólisis con HCl 1,5 N, se pasó por un filtro de 500 µm y se le adicionó 5 ml de agua destilada para ser procesada por medio de un homogeneizador (OMNI® TH220 International) en un tubo falcon por 3 minutos a máxima velocidad; 500 µl del hidrolizado de tunicina fueron colocados en un

agitador que produce un movimiento rotatorio manteniendo la cubierta de la placa Petri invertida como soporte fijo y la parte superior de la misma placa como rotor, con la utilización de un motor de 60 rpm y 12 volts por 2 min.

1.1.2 Producción de varillas de tunicina en seco

Tres ml de la solución de tunicina obtenida mediante la hidrólisis 1,5N se dispersaron en una placa petri y se adicionaron 2 ml de agua destilada, para ser secados a 70°C en una estufa (Science Teaching Incubator, Lab-line instruments Incs.®). La película de tunicina secada fue extraída por fricción generando las varillas en seco.

1.2 Síntesis de HAp a partir de cáscaras de huevo.

Las cáscaras de huevo, de *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758), fueron inicialmente fragmentadas y sometidas a una limpieza que consistió en calentar en solución de H₂O₂ al 30 % (Merck®) por 1 hora hasta la ebullición. Este procedimiento se realizó 2 veces. Las cáscaras procesadas fueron limpiadas con agua desionizada y secadas a 48,5 °C en una estufa (Science Teaching Incubator, Lab-line instruments Incs.®), para posteriormente ser molidas y pulverizadas manualmente a fin de obtener partículas de diámetro menor a 100 µm con la ayuda de un tamizador de 90 µm (Tyler®). Obtenido el polvo de la cáscara de huevo, 2,5 M de Ca de cáscara pulverizada se suspendieron en una solución acuosa (1,002 gr en 10 ml de H₂O destilada), en agitación constante a 35-40 °C. Se adicionó gota a gota simultáneamente, una solución de H₃PO₄ 1,5M (Vetec Analytical Reagents®) junto con la solución de polvo de cáscara de huevo 2,5 M, en 10 ml de H₂O en agitación constante a 35-40 °C, manteniendo una relación Ca:P de 1,67. Finalmente, el producto fue filtrado y lavado continuamente con agua desionizada hasta obtener un pH neutro. El producto obtenido fue secado a 60 °C (Science Teaching Incubator, Lab-line instruments Incs.®) y prensado a 10.000 ton para formar un bloque sólido de 12 mm de diámetro mediante la utilización de una prensa hidráulica (Graseby Specac®).

1.3 Producción de un compuesto de HAp y tunicina.

Para producir un compuesto, se adicionó gota a gota simultáneamente 10 ml de una solución de H_3PO_4 1,5 M (Vetec Analytical Reagents®) y 10 ml de una solución de cáscara de huevo 2,5M, a 15 ml de una solución de tunicina al 0,1% en agitación constante a 35-40°C, manteniendo una relación Ca:P de 1,67. El polvo obtenido fue filtrado y lavado continuamente con agua desionizada hasta obtener un pH neutro. El resultado fue secado a 60°C (Science Teaching Incubator, Lab-line instruments Incs®) y se adicionaron varillas de tunicina formadas en seco para obtener una relación HAp:Tun de 70:30 y 80:20 con y sin la incorporación de 0,5 ml de gelatina al 5 % por cada 0,6 g de pastilla total. Las varillas y la HAp mezcladas fueron prensadas a 10.000 ton para formar un bloque sólido de 1,2 cm de diámetro mediante la utilización una prensa hidráulica (Graseby Specac®)

1.4 Obtención de HAp con porosidad controlada.

Para la obtención de la HAp con porosidad controlada, se calcinaron bloques sólidos del compuesto de HAp y tunicina a 1200 °C por 4h en una mufla (Barnstead / Thermolyne®).

2. Fase de caracterización

2.1 Análisis químico.

2.1.1 Espectroscopía de rayos X o XRD

Cerca del 95% de todos los materiales sólidos pueden ser caracterizados como cristalinos. Cuando los rayos X interactúan con una fase o sustancia cristalina, se obtiene un patrón de difracción. Cada sustancia cristalina otorga un patrón que se repite siempre y que en una mezcla de sustancias cada uno de los componentes produce un patrón independiente del resto (Hull, 1919), por lo tanto, el patrón de difracción de rayos X es un método adecuado para la caracterización e identificación de fases policristalinas.

Mediante la utilización de un Difractómetro de rayos X Siemens D-5000 con radiación $\text{CuK}\alpha$, se obtuvieron los difractogramas de las muestras de tunicina hidrolizada, cáscara de huevo calcinada como no calcinada, HAp e HAp calcinada y del compósito de HAp y tunicina.

2.1.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier o FT-IR

El espectro vibracional de una molécula se considera como una propiedad física única y es característica de cada molécula. De esta forma, el espectro infrarrojo puede ser utilizado como una “huella” para la identificación por comparación del espectro de un compuesto desconocido con espectros de referencia previamente obtenidos (Coates, 2000). En ausencia de la base de datos de referencia, es posible efectuar una interpretación básica del espectro mediante los principios básicos, basados en el hecho que características estructurales de la molécula, como su esqueleto y los grupos funcionales, producen absorciones características y reproducibles en el espectro.

Para obtener el espectro FT-IR de la HAp en polvo se utilizó un equipo Bruker Vector 22 y se comparó con base de datos internacional de la muestra.

2.2 Análisis físico

2.2.1 Análisis clásico volumétrico de adsorción.

Para realizar esta medición se utilizaron 2 muestras de cada uno de los bloques de HAp porosa obtenida por calcinación en una relación de HAp:Tun 70:30 y 80:20, tanto con o sin gelatina, resultando un total de 8 muestras. Se determinó el área superficial de la HAp porosa, la cual considera por definición el área superficial externa de la HAp y el área superficial interna debida a los poros de la misma. Esta medición se realiza mediante un equipo de adsorción de gas o Sorptómetro (Micrometrics ASAP 2010). Este procedimiento consiste en medir en forma volumétrica la cantidad de gas antes y después de la adsorción por los poros de la pastilla y obtener por diferencia lo que se ha adsorbido. Como adsorbato

se utiliza nitrógeno a temperatura líquida. El gas adsorbido es arrastrado por un gas transportador, que comúnmente es Helio por su inactividad y bajo punto de condensación, y posteriormente medido en un Catarómetro (Droguett, 1980)

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un Análisis de varianza (ANDEVA) por medio de la aplicación del software estadístico InfoStat 2004, tomando como variables el área superficial en relación a la presencia o no de gelatina y la relación HAp:Tun.

2.2.2 Medición de la resistencia y deformación

Dentro de los métodos directos para medir resistencia, se utilizó la Fuerza Compresiva de Fractura Cuasi-estática en el Durómetro TSS QC-SPA. Este equipo, además de la medición de la deformación máxima, permite la cuantificación de la resistencia en el momento de su fractura. El procedimiento consiste en comprimir con fuerzas crecientes sobre el centro del bloque por medio de una punta roma de 0,2 mm de diámetro y 4 cm de altura en un anillo de 1 cm de diámetro, aplicando una velocidad de 3 mm/seg, a una altura de 4,5 cm por sobre la superficie basal. La medición se efectuó para igual cantidad de muestras que el análisis anterior. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un Análisis de varianza (ANDEVA) por medio de la aplicación del software estadístico InfoStat 2004, tomando como variables el área superficial en relación a la presencia o no de gelatina y la relación HAp:Tun.

2.2.3 Espectrofotometría

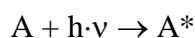
La espectrofotometría es una de las técnicas experimentales más utilizadas para la detección específica de moléculas. Se caracteriza por su precisión, sensibilidad y su aplicabilidad a moléculas de distinta naturaleza y estado de agregación (sólido, líquido, gas). Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Cuando decimos que una sustancia química absorbe luz de longitud de onda λ , esto significa que las moléculas de esa sustancia absorben fotones de esa longitud de onda.

La siguiente ecuación representa la luz absorbida en función de la longitud de onda.

$$E_{\text{fotón}} = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$$

Ecuación (1). Donde c es la velocidad de la luz, ν es su frecuencia, λ su longitud de onda y $h = 6.6 \cdot 10^{-34}$ J·s es la constante de Planck.

Para la realización de la espectrofotometría se utiliza la absorción de luz en el ultravioleta cercano ($\lambda \approx 325\text{-}420$ nm) y en el visible ($\lambda \approx 420\text{-}900$ nm). Cuando una molécula absorbe un fotón en este intervalo espectral, se excita pasando un electrón de un orbital del estado fundamental a un orbital excitado de energía superior. De esta manera la molécula almacena la energía del fotón:



$$E(A^*) = E(A) + E_{\text{fotón}}$$

Ecuación (2). Energía almacenada en el fotón. Como la energía se conserva, la diferencia de energía entre el estado fundamental de la molécula (A) y su estado excitado (A^*) debe ser exactamente igual a la energía del fotón. Es decir, una molécula sólo puede absorber fotones cuya energía $h \cdot \nu$ sea igual a la energía de un estado molecular excitado. Cada molécula tiene una serie de estados excitados discretos (o bandas) que dependen de su estructura electrónica y que la distinguen del resto de moléculas. Como consecuencia, el espectro de absorción, es decir, la luz absorbida en función de la longitud de onda, constituye una verdadera señal de identidad de cada sustancia o molécula.

La absorbancia de las soluciones de tunicina obtenidas mediante la hidrólisis se determinó por medio de un espectrofotómetro (ATI UNICAM® UV/Vis Spectrometer UV2) a un $\lambda \approx 400$ nm.

2.3 Análisis morfológico

2.3.1 Microscopía electrónica de Barrido o SEM

La observación de cada estructura fue realizada mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido o SEM, que consiste en el uso de un haz de electrones que barre la superficie de una muestra creando una imagen tridimensional mediante el uso de detectores ubicados al interior que reciben las señales de los electrones.

Se observaron muestras de tunicas de *Pyura chilensis* previo blanqueado y posterior al blanqueado, tunicina posterior a la hidrólisis, varillas de tunicina en agua, varillas de tunicina en seco, HAp en polvo, compósito de HAp y tunicina e HAp porosa.

Para la preparación del material resultante en medio líquido (varillas en agua y tunicina) se suspendió 1 ml del producto obtenido en 10 ml de acetona al 99,8 % en una placa Petri calentada a 50 °C hasta la evaporación de la acetona. El resto de las muestras no requieren preparación previa. Para realizar este análisis, las muestras fueron sombreadas con 20 nm de oro en una sombreadora EMS-550 y fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido TESLA BS 343A a 15KV.

RESULTADOS

1. Análisis químico

1.1 Espectroscopía de rayos X o XRD

Para identificar los productos obtenidos en cada tratamiento se realizó un análisis de difracción de rayos X, donde en base a la interacción de los rayos X con las caras cristalinas se obtiene un patrón de difracción con distintas intensidades. Son estas intensidades las que permiten identificar los distintos componentes de la muestra y compararlas con patrones internacionales. Se realizaron los análisis de XRD de las muestras de tunicina hidrolizada, cáscara de huevo tanto calcinada como no calcinada, HAp e HAp calcinada y del compósito de HAp y tunicina.

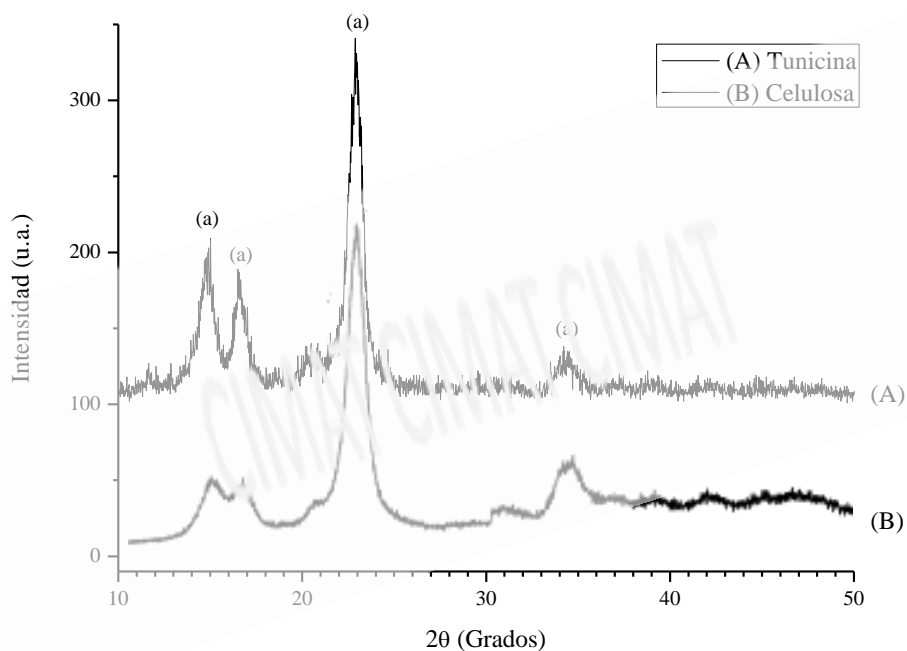


Figura 1. Difractograma XRD de la tunicina hidrolizada (A) y de celulosa obtenido por Zhao et al. (2006) (B).

En la figura 1 se identificaron los picos indicadores de celulosa (a). Tanto en la figura 1A como 1B se registra similitud en los ángulos 2θ: 22,8 (a), 15,06 (a), 16,38 (a) y 34,15 (a).

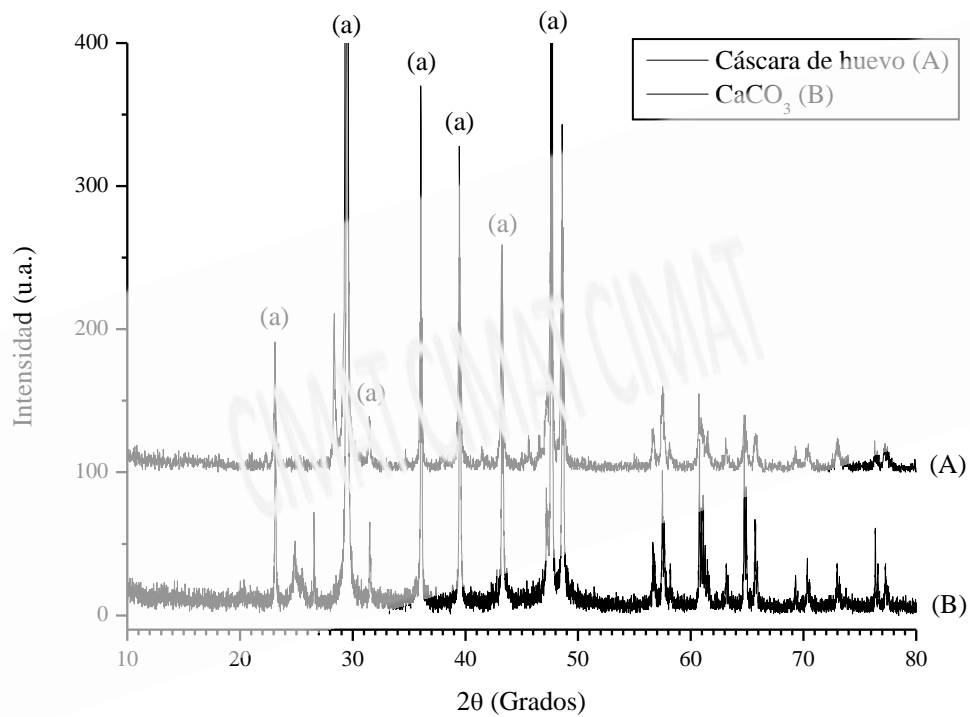


Figura 2. Difractograma XRD de la cáscara de huevo (A) y calcita (B).

En la figura 2 se han identificado los picos más importantes de la cáscara de huevo (a) con respecto al estándar de calcita (University of Arizona Mineral Museum Ref: 6965). Los picos corresponden a los ángulos 2θ : 29,40; 48,69; 47,45; 43,18; 39,40, 36,0; 28,39 y 23,04.

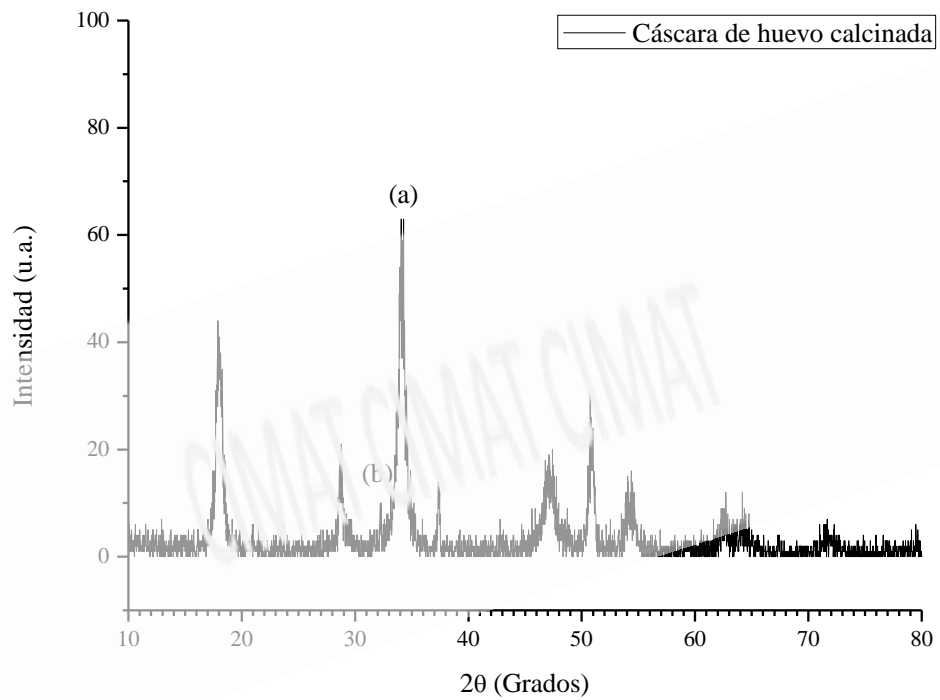


Figura 3. Difractograma XRD de la muestra de cáscara de huevo calcinada a 1200 °C.

En la figura 3, se han identificado el pico indicador de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (a) y CaO (b). Los picos de mayor intensidad registrados se ubican en los ángulos 2θ : 34,07 (a); 18,03; 50,81; 48,33; 28,82; 54,33 y 47,33.

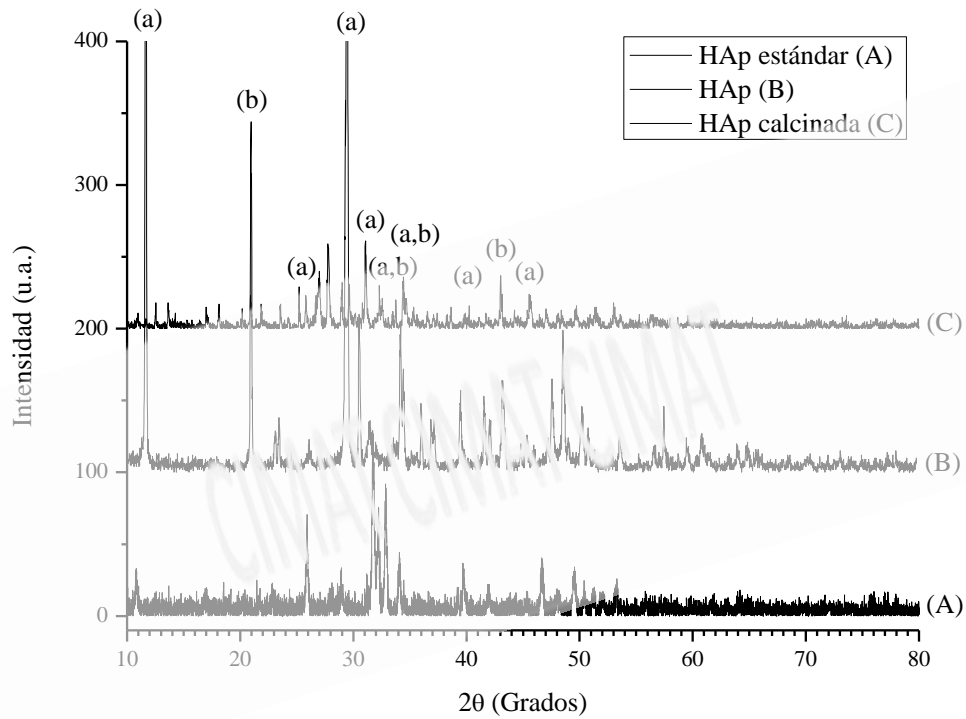


Figura 4. Difractograma XRD de HAp en polvo (B), HAp calcinada a 1200 °C (C) y estándar de HAp sintética (American Museum of Natural History Ref:15214) (A).

En la figura 4, se han identificado los picos indicadores de HAp (a) y de la HAp carbonatada (b). Los picos de mayor intensidad registrados se ubican en los ángulos 2θ : 11,59 (a); 29,30 (a), 20,99 (b); 33,23 (a, b), 34,10 (a, b); 42,95 (b) 43,03 (a).

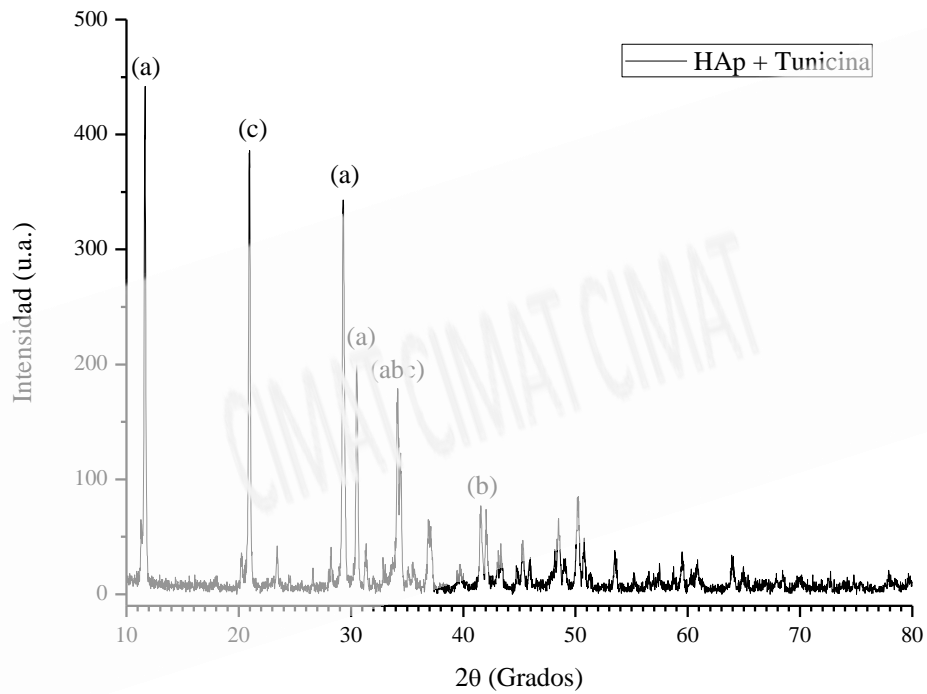


Figura 5. Difractograma XRD del compuesto de HAp y tunicina en polvo.

En la figura 5, se han identificado los picos indicadores de HAp (a) de HAp carbonatada (b) y tunicina (c). Los picos de mayor intensidad registrados se ubican en los ángulos 2θ : 11,59 (a); 20,92 (c), 29,32 (a); 30,50 (a), 34,20 (a, b, c); 41,62 (b).

1.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier o FT-IR

De la misma forma que el XRD permite identificar moléculas en un polvo, la técnica FT-IR indirectamente puede confirmar la presencia o ausencia de un grupo funcional o determinado enlace químico en un material. El principio utilizado es la vibración propia infrarroja que poseen las moléculas.

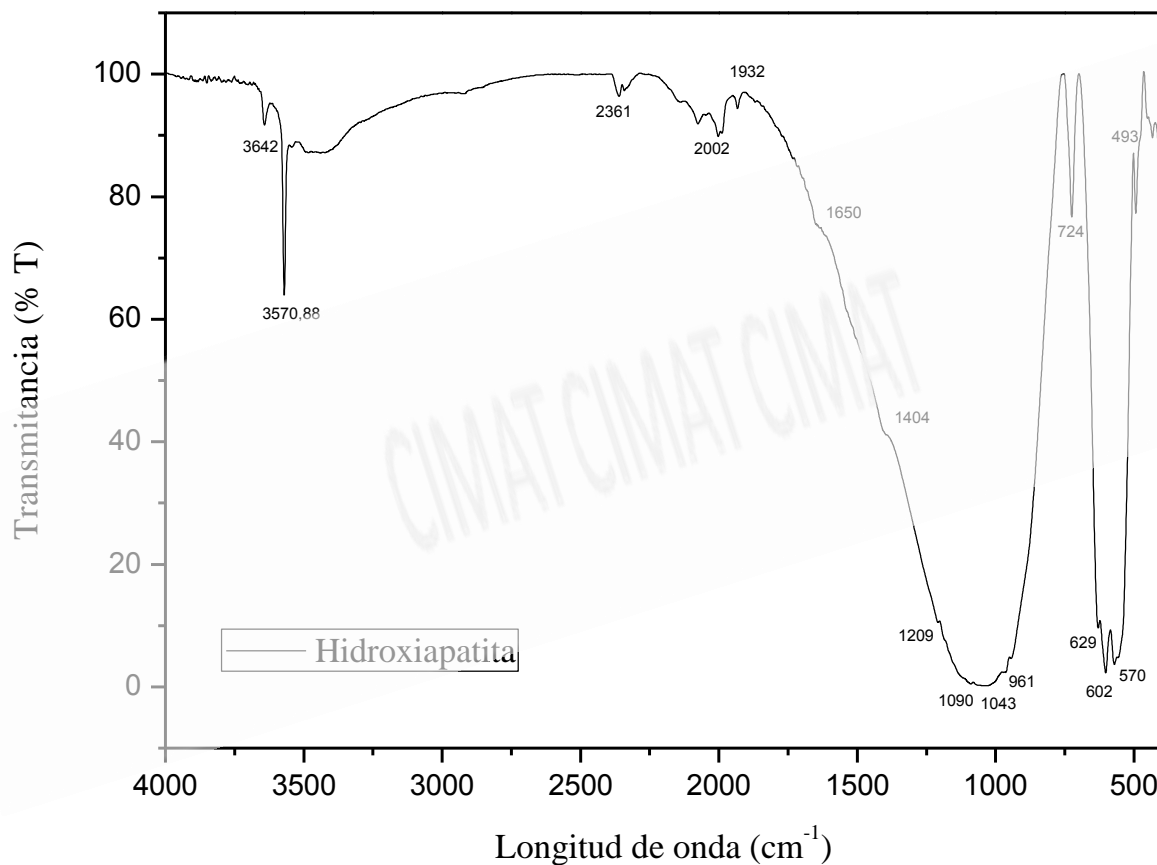


Figura 6. FT-IR de la HAp calcinada en polvo.

La figura 6 presenta las siguientes bandas de absorción ubicadas en las longitudes de onda de 3642, 3570, 2361, 2002, 1932, 1650, 1404, 1209, 1090, 1043, 961, 724, 629, 602, 570 y 493 cm⁻¹.

2. Análisis físico

2.1 Análisis clásico volumétrico de adsorción:

Tabla 1. Áreas superficiales de los bloques de HAp porosa en función de la presencia o no de gelatina y la concentración de tunicina empleada en la síntesis.

G	HAp/Tun	h (mm)	P (gr)	ASP (m²/g)
Sin gelatina	70/30	2,166	346,1	1,0460
Sin gelatina	70/30	2,117	341,4	0,5858
Sin gelatina	80/20	1,968	345,8	0,3705
Sin gelatina	80/20	2,086	395,5	0,7475
Con gelatina	70/30	1,920	344,1	1,5450
Con gelatina	70/30	2,301	330,5	0,7484
Con gelatina	80/20	2,009	346,4	0,8758
Con gelatina	80/20	2,033	339,2	1,1660

Siendo **G** la presencia de gelatina, **HAp/Tun** la concentración entre HAp y tunicina, **h** el grosor promedio de las pastillas medidas en 3 puntos al azar, **P** el peso de la pastilla y **ASP** el área superficial de la pastilla.

Considerando las muestras sin gelatina de manera independiente a HAp/Tun, la media de ASP es $1,08 \pm 0,35$ m²/g con un coeficiente de variación (CV) de 32,63, mientras que las muestras con gelatina poseen una media de ASP de $0,69 \pm 0,28$ m²/g con un CV de 41,40. Esta variable analizada de manera independiente en un ANDEVA, arroja un valor de $p = 0,2006$, por lo que no es estadísticamente significativo. Por otra parte, considerando sólo HAp/Tun sin asociar la presencia o ausencia de gelatina, las muestras con una HAp/Tun = 70/30 poseen una media de ASP de $0,9808 \pm 0,42$ m²/g con un CV de 42,94, mientras que el caso de una HAp/Tun = 80/20, la media alcanza el valor de $0,79 \pm 0,33$ m²/g con un CV de 41,76. En el ANDEVA esta variable entrega un valor de $p = 0,5009$ por lo que no presenta diferencias estadísticas. La interacción entre G y HAp/Tun fue de igual manera sometida a un ANDEVA arrojando como resultados un $p = 0,8126$, mientras que la media para el grupo G 70/30 fue de $1,15 \pm 0,56$ m²/g CV = 49,15, para el grupo S 70/30 fue de $0,82 \pm 0,33$ m²/g CV = 39,88, en la muestra G 80/20 se obtuvo una media de $1,02 \pm 0,21$

m^2/g CV = 20,10 y para el grupo S 80/20 la media fue de $0,56 \pm 0,27 \text{ m}^2/\text{g}$ y un CV = 47,69. No encontrándose diferencias estadísticas significativas.

2.2 Medición de la resistencia y deformación

Tabla 2. Deformación y resistencia mecánica de las muestras de HAp porosa en función de la presencia o no de gelatina y la concentración.

G	HAp/Tun	P (gr)	H (mm)	D Máx (mm)	R (g)
Sin gelatina	70/30	338,8	2,005	0,3	369
Sin gelatina	70/30	325,9	2,161	0,37	358
Sin gelatina	80/20	387,3	2,136	0,48	707
Sin gelatina	80/20	376,1	2,079	0,47	742
Con gelatina	70/30	324,5	2,410	0,4	233
Con gelatina	70/30	342,4	2,411	0,41	235
Con gelatina	80/20	356,2	2,121	0,29	665
Con gelatina	80/20	353,3	2,073	0,33	625

Siendo G la presencia o ausencia de gelatina, HAp/Tun la relación entre HAp y Tunicina, h el grosor promedio de las pastillas medidas en 3 puntos al azar, P el peso de la pastilla, D Máx la deformación máxima y R la resistencia mecánica a la presión.

2.2.1 Deformación máxima.

Las muestras con gelatina arrojaron una media de $0,36 \pm 0,06 \text{ mm}$ y un CV = 16,05, mientras que en las muestras sin gelatina se obtuvo una media de $0,41 \pm 0,09 \text{ mm}$ y un CV = 21,19. El ANDEVA resultó en un $p = 0,4323$ para esta variable de manera independiente, no encontrándose diferencias estadísticas significativas. En el caso de la variable HAp/Tun, las muestras con una proporción 70/30 poseen una media de $0,37 \pm 0,05 \text{ mm}$ y un CV = 13,42 y las muestras con un HAp/Tun de 80/20 tienen una media de $0,39 \pm 0,10 \text{ mm}$ y un CV = 24,65, no existiendo diferencias significativas ya que el p obtenido fue de 0,7027. La asociación de ambas variables entrega para las muestras de G 70/30 una media de $0,41 \pm 0,01 \text{ mm}$ y un CV = 1,75, para las muestras G 80/20 una media de $0,31 \pm 0,03 \text{ mm}$ y un CV = 9,12, mientras que de las muestras S 70/30 se obtiene una media de $0,34 \pm 0,05 \text{ mm}$ y un

CV = 14,78 y en el caso de las muestras S 80/20 la media es $0,48 \pm 0,01$ mm y un CV = 1,49. La interacción de ambas variables entrega un valor de $p = 0,6633$, que no es estadísticamente significativo

2.2.2 Resistencia mecánica

La estadística descriptiva para las muestras con gelatina arrojó una media de $439,5 \pm 237,85$ g y un CV = 54,12, mientras que las muestras sin gelatina la media fue de $544 \pm 208,96$ g con un CV = 38,41. Al realizar el ANDEVA se obtiene un $p = 0,0015$, por lo que existen diferencias estadísticas al utilizar o no gelatina en relación a la resistencia mecánica. Considerando únicamente la HAp/Tun, se desprende para el grupo 70/30 una media de $298,75 \pm 74,91$ g y un CV de 25,07, mientras que para las muestras 80/20 la media es $684,75 \pm 50,77$ g con un CV de 7,41. En el ANDEVA se logra obtener un $p = <0,0001$ encontrándose diferencias estadísticas al considerar exclusivamente esta variable. Finalmente al asociar ambas variables se obtiene para el grupo G 80/20 una media $645 \pm 28,28$ g y un CV de 4,39, para el grupo G 70/30 una media de $234 \pm 1,41$ g y un CV de 0,6, para el grupo S 70/30 una media de $363,5 \pm 7,78$ g y un CV = 2,14, mientras que para el grupo S 80/20 una media de $724,5 \pm 24,75$ g y un CV = 24,75. Ambas variables asociadas arrojan un $p = <0,0001$ del cual se concluye la existencia de diferencias estadísticas tanto dentro de los tratamientos como entre tratamientos.

2.3 Espectrofotometría

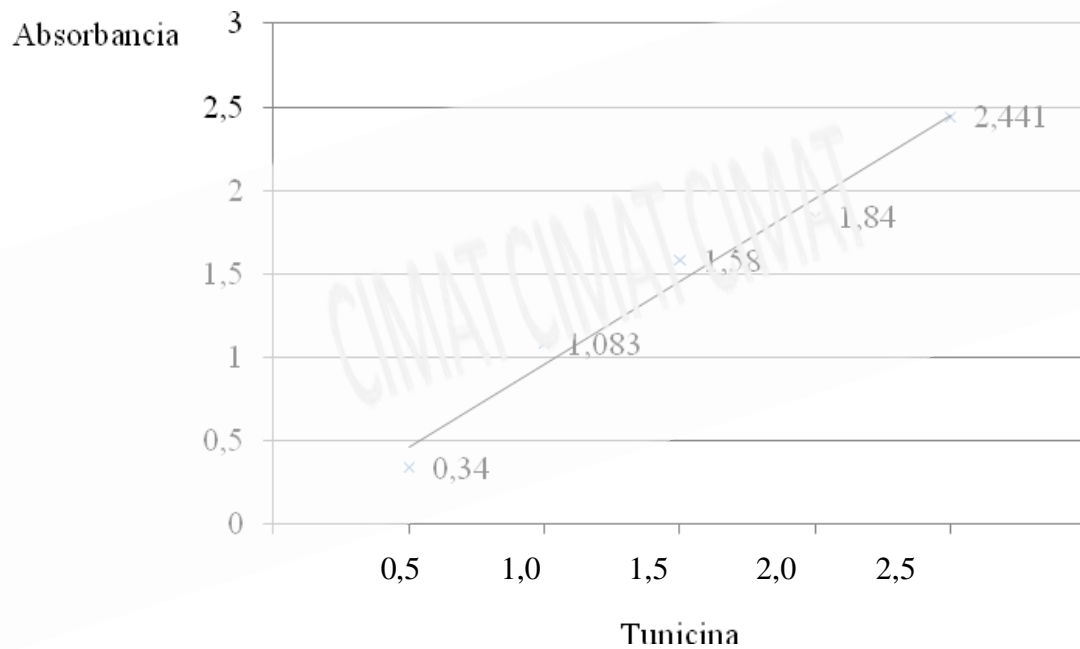


Figura 7. Absorbancia a 400nm para distintas tunicinas obtenidas por hidrólisis con HCl a diferentes concentraciones.

La fórmula para línea de tendencia estimada de la figura 7 es de $y = 0,4959x - 0,0309$ con un R2 de 0,9768.

3. Análisis morfológico

3.1 Microscopía electrónica de barrido o SEM.

3.1.1 Túnicas de *Pyura chilensis*.

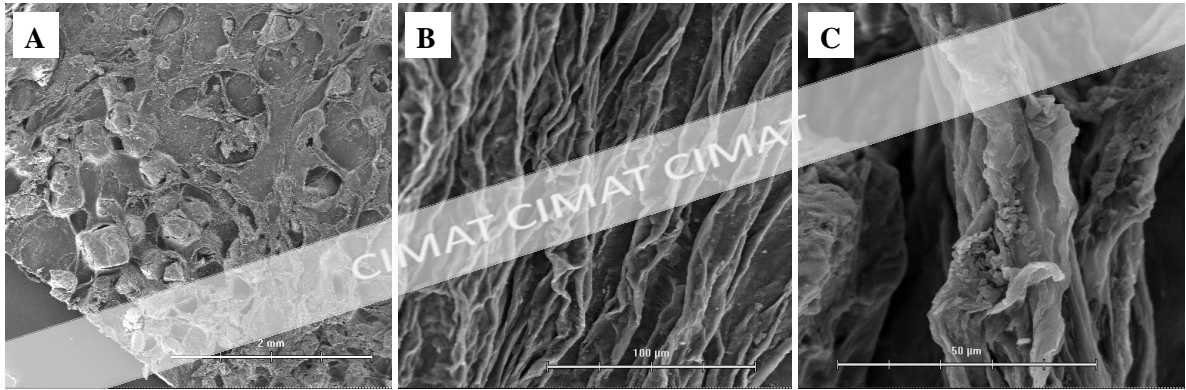


Figura 8. Imágenes SEM de la túnica de *Pyura chilensis* a 33x (A), 670x (B) y 1700x (C)

En la figura 8A, la túnica de *Pyura chilensis* vista superficialmente se muestra como pliegues de gran tamaño que se pueden encontrar en distintas direcciones entre las cuales quedan atrapadas partículas de arena y restos orgánicos e inorgánicos impropios a la túnica. En el caso de la figura 8B, el aumento de 670x permite distinguir pliegues de menor tamaño que forman parte de los pliegues mayores antes observados, dentro de los cuales se ubican otras estructuras ovaladas adosadas de tamaños mucho menores (Fig. 8C).

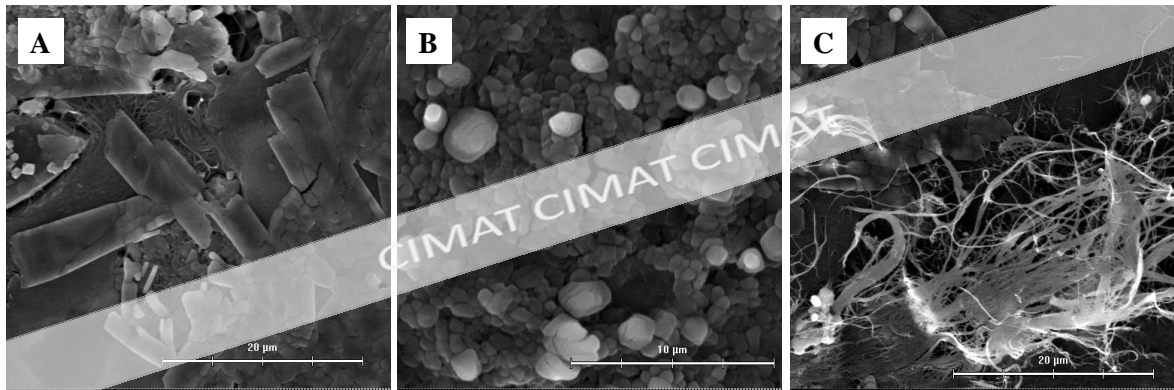


Figura 9. Imágenes SEM de la túnica de *Pyura chilensis* posterior al tratamiento de blanqueado a 3300x (A) y 6700x (B, C)

Se puede observar que la túnica está formada por subestructuras de menor tamaño con forma de listones que se encuentran en forma longitudinal a la túnica (Fig. 9A), o entrecruzadas entre ellas de forma transversal, siempre formando grupos de más de 10 listones (Fig. 9B). Los listones que forman la túnica en los extremos más expuestos al tratamiento de blanqueado, pierden su organización y se disgregan en barbillas de diámetro variable que oscila desde los varios micrones a nanómetros que finalmente son totalmente separadas entre sí en la hidrólisis (Fig. 9C).

3.1.2 Fibras de tunicina hidrólizadas

Se visualizaron con un aumento de 33000x cada muestra de tunicina individualmente. El diámetro de estas fibras o listones estuvo entre los 19 a 542 nm para las fibras tratadas con la concentración de HCl 2,5N, y entre los 83 a 649 nm para las fibras obtenidas con una concentración de HCl de 2,0N. La diferenciación individual de las fibras en el resto de las concentraciones no fue posible debido a que en su mayoría permanecían unidas a una estructura mayor formada por un grupo de fibras de tunicina que se denominaron flóculos.

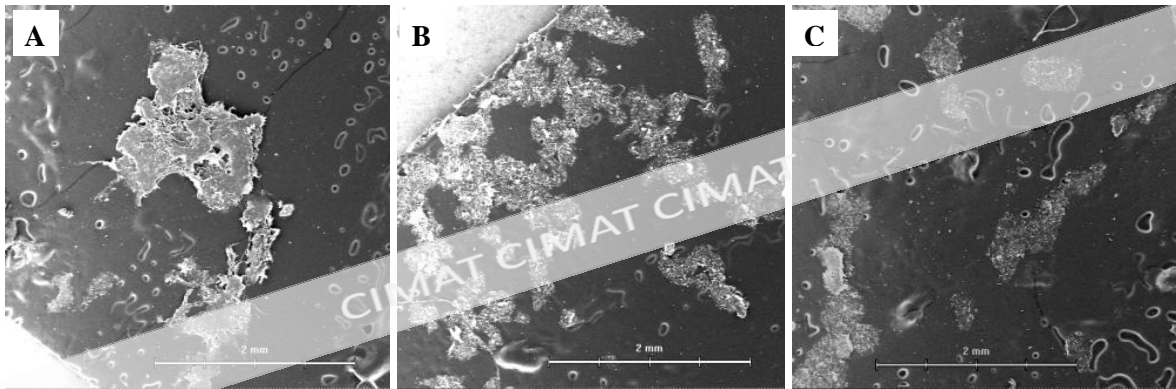


Figura 10. Imágenes SEM a 33x de los flóculos de tunicina obtenidos por medio de la hidrólisis 0,5 N (A), 1,5 N (B) y 2,0 N (C)

Se observan fragmentos de tunicas sin hidrolizar (A), y flóculos con diferente diámetro y dispersión (B y C)

La visualización 33x (Fig. 10) permitió determinar el diámetro obtenido de los flóculos de tunicina para las concentraciones de 0,5N, 1,5N y 2,0N. La tunicina obtenida por medio de la hidrólisis con la concentración de 0,5N (Fig. 10A) se encontraba formando parte de estructuras sólidas que corresponden a fragmentos de túnica pobremente hidrolizados. Los flóculos obtenidos en el tratamiento 1,5N (Fig. 10B) poseen un diámetro promedio de $241,64 \pm 110,76 \mu\text{m}$, con un valor máximo de $506 \mu\text{m}$ y un valor mínimo de $37,6 \mu\text{m}$. Para el tratamiento 2,0N (Fig. 10C) se obtuvo un tamaño de flóculos de $450,45 \pm 357,05 \mu\text{m}$ con un valor máximo de $1460 \mu\text{m}$ y un valor mínimo de $213 \mu\text{m}$.

3.1.3 Varillas de tunicina en agua

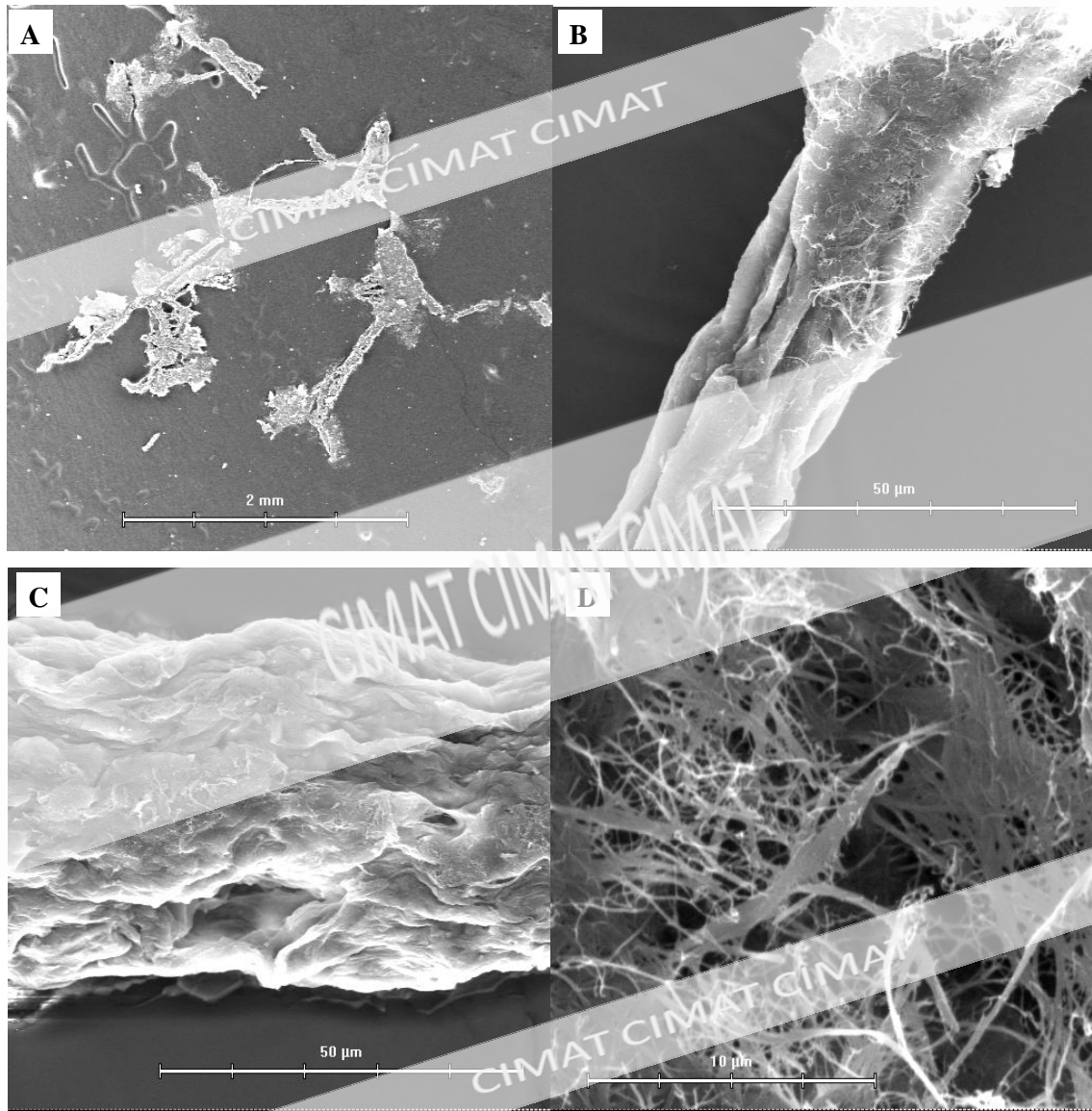


Figura 11. Imágenes SEM de varillas de tunicina obtenidas por medio de fricción en agua a 33x (A), 1700x (B), 1700x (C) y 6700x (D).

Al visualizar las muestras obtenidas con el tratamiento de fricción en agua destaca a los 33x, que las fibras de tunicina se agrupan generando varillas cilíndricas de largos variables. Estas varillas mantienen un diámetro individual constante en su estructura se encuentra alrededor de los $100 \pm 42,9515 \mu\text{m}$ con un valor máximo de $234 \mu\text{m}$ y un valor

mínimo de 43,2 μm . (Fig. 11A y 11B). Cada varilla está formada por un conjunto de fibras de tunicina agrupadas y entrecruzadas, esta observación se desprende al visualizar con mayor aumento cada unidad a 1700x (Fig. 11C) y 6700x (Fig. 11D), complementando lo observado en el blanqueado (Fig. 9).

3.1.4 Varillas de tunicina en seco.

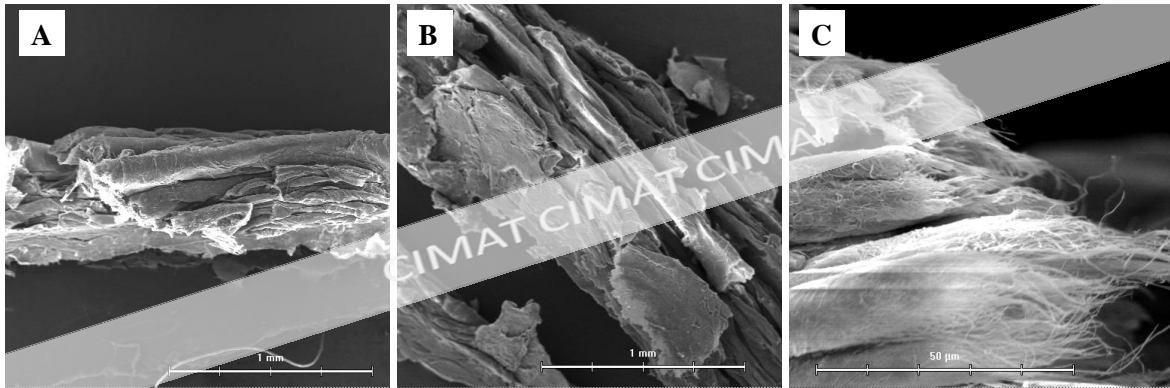


Figura 12. Imágenes SEM de varillas de tunicina obtenidas por medio de fricción en seco a 67x (A y B) y 1700x (C).

A diferencia de las varillas obtenidas en el método anterior, las varillas producidas en seco poseen diámetros mayores cercanos a 1mm y en algunos casos mayores. Debido a su gran tamaño se necesitaría de un gran número de observaciones al microscopio de barrido para realizar estadística descriptiva. Una de las principales diferencias también es la irregularidad de su estructura, que más bien se muestra como un cilindro (Fig. 12A) formado por pliegues entre los cuales quedan espacios sin tunicina (Fig. 12B). Los extremos superior e inferior de la varilla muestran la naturaleza fibrilar originada por un conjunto de listones de pequeño diámetro tal como se observó en el método producido en agua (Fig. 12C).

3.1.4 HAp en polvo

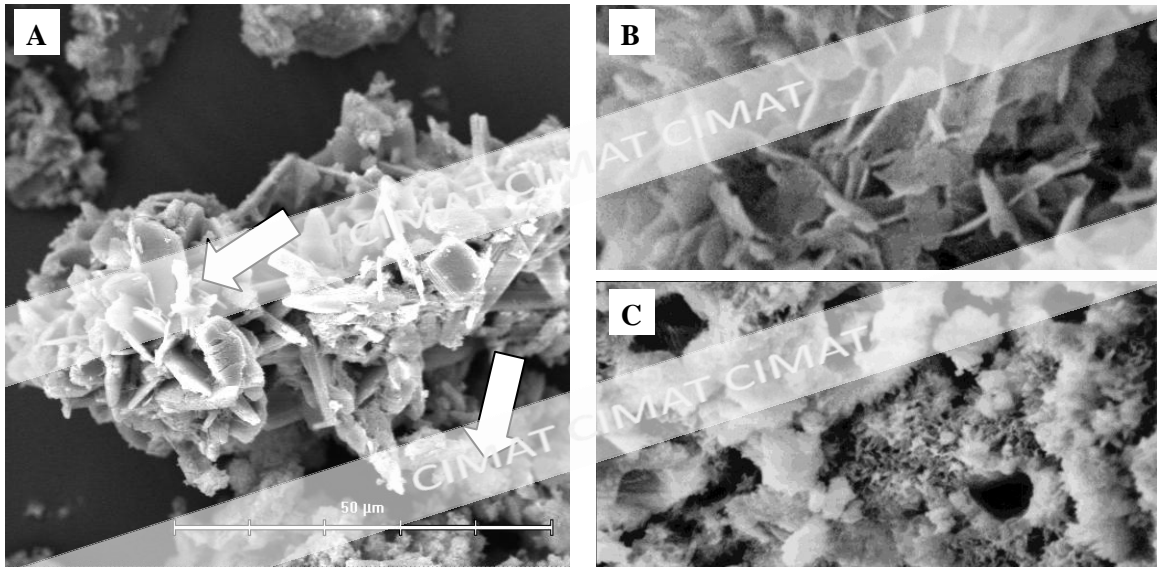


Figura 13. Imágenes SEM de HAp en polvo sintetizada a partir de la cáscara de huevo (1700x A) comparadas con dos imágenes de HAp, cristalina (B) y amorfa (C) a 3300x.

La figura 13 muestra el producto de la síntesis de HAp, donde coexisten dos formas de cristales, una con forma de láminas pequeñas que se entrecruzan (Fig. 13B), y en los extremos de la imagen e interpuesto entre las láminas la HAp adopta una disposición de los cristales amorfa (Fig. 13C) (Brown *et al.* 1994).

3.1.6 Compósito de HAp y tunicina

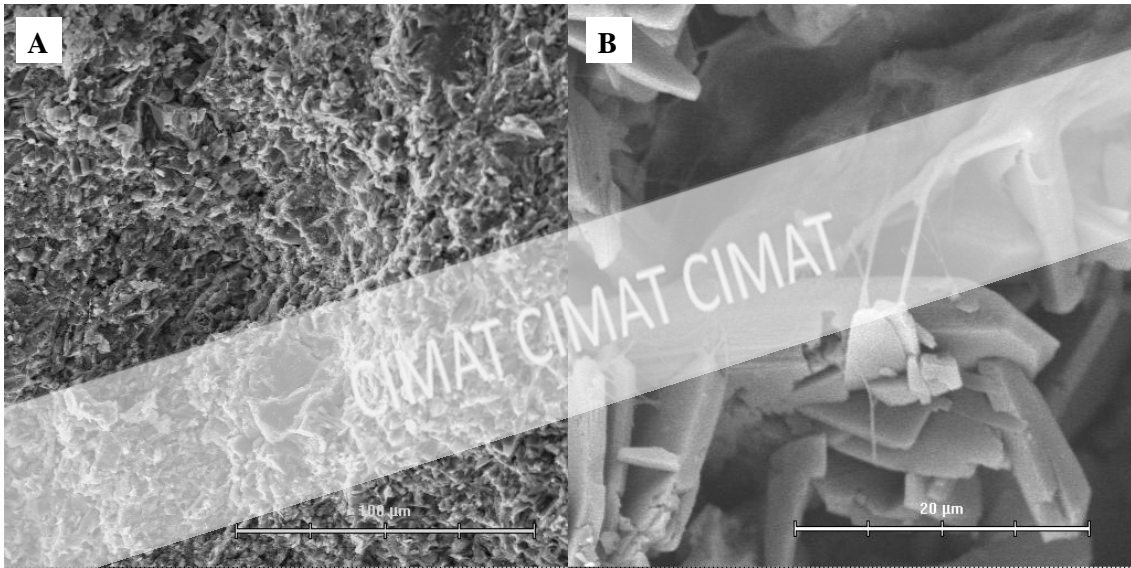


Figura 14. Imagen SEM del compuesto de HAp y tunicina a 670x (A) y 3300x (B)

El compuesto de HAp y Tunicina se muestra como un bloque de cristales y fibras que a simple vista no es posible diferenciar en donde no existen grietas ni porosidades distinguibles (Fig. 14A). Con un aumento de 3300x (Fig. 14B), es posible reconocer los cristales de HAp y un conjunto de fibras que producen una conexión entre sí manteniendo la cohesión del compuesto.

3.1.7 Bloque de HAp porosa

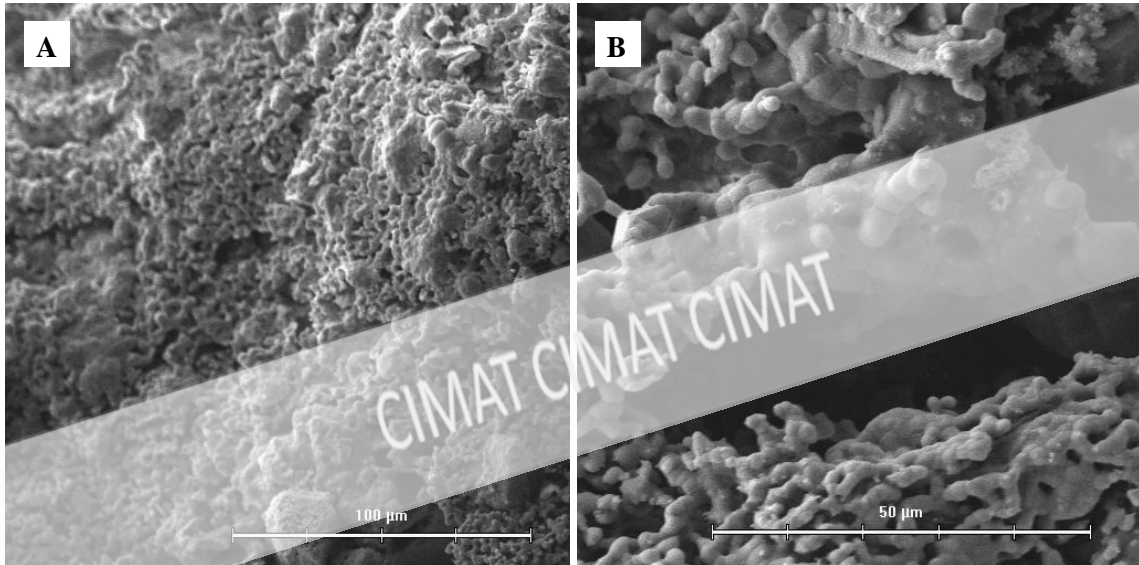


Figura 15. Imagen SEM de la HAp porosa obtenida utilizando varillas en agua a 670 (A) y 1700x (B).

Las figuras 15A y 15B muestran la HAp como una estructura porosa dada principalmente por microporos interconectados que poseen un diámetro promedio de $2,162 \pm 1,011 \mu\text{m}$, con un valor máximo de $5,69 \mu\text{m}$ y un valor mínimo de $0,105 \mu\text{m}$. Es posible encontrar, aunque en menor medida, macroporos que pueden alcanzar un diámetro de $80 \mu\text{m}$.

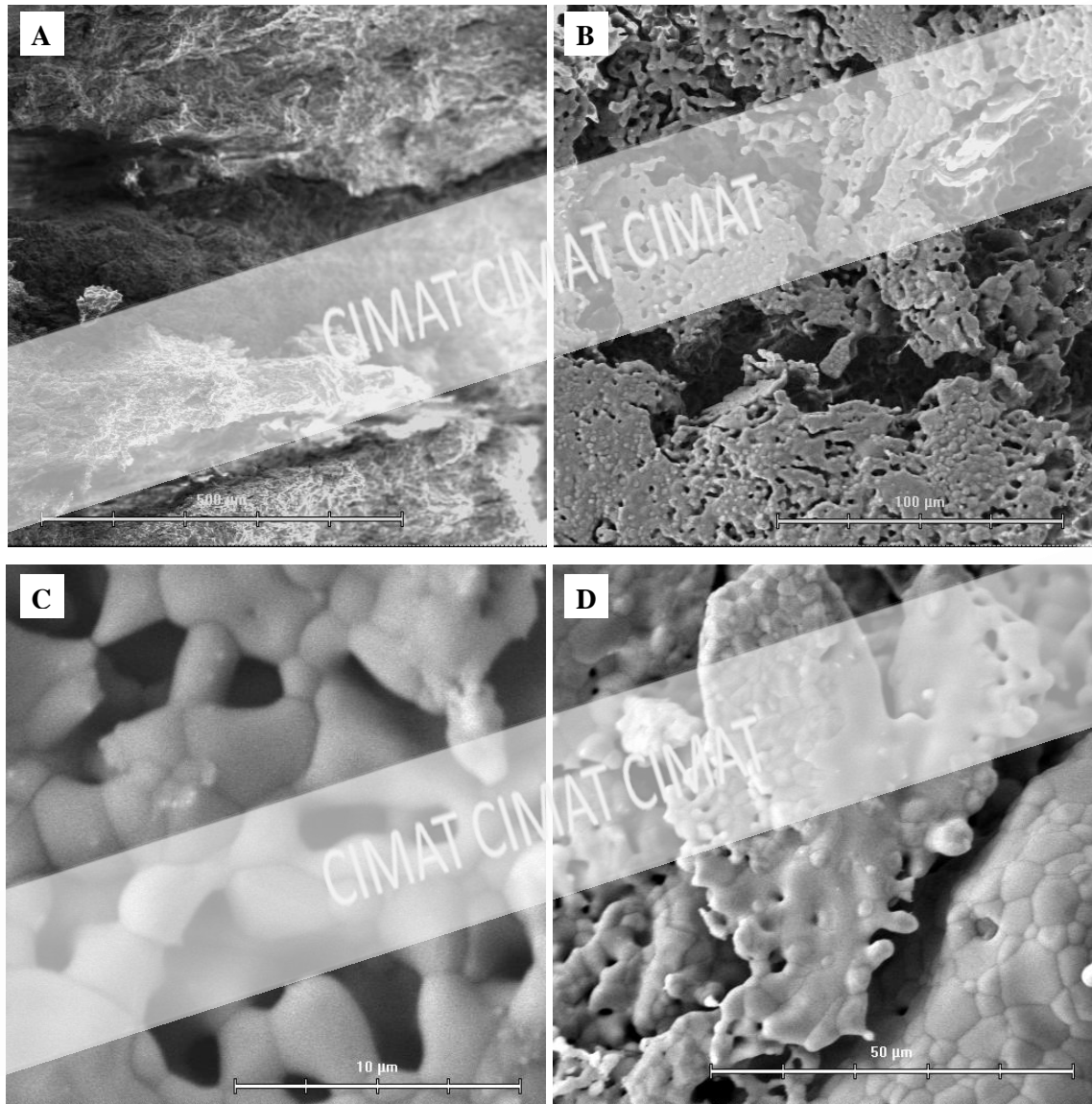


Figura 16. Imagen SEM de HAp porosa utilizando el método con varillas en seco a 170x (A), 670x (B), 1700x (C) y 6700x (D).

Con la utilización de varillas en seco los macroporos superan ampliamente los 200 µm (Fig. 16A y 16B), existe interconexión entre ellos y se distribuyen de distinta manera dependiendo de la utilización o no de gelatina en la formación del compuesto. Coexiste también una interconectividad dada por la presencia de la microporosidad que no exhibe diferencias con respecto al método anterior.

La HAp porosa se muestra como un conjunto de cristales redondeados fusionados con límites marcados, entre los cuales se interponen macroporos (Fig. 16C) y microporos interconectados (16B).

DISCUSIÓN

Fase de extracción de tunicina.

En la medida que se avanza en el proceso de blanqueado la estructura arrugada pero sólida de la túnica se pierde dando paso a una red de listones dispuestas en distintas direcciones. La visualización de esta red ha sido documentada previamente para fibras de celulosa vegetal, por Taniguchi y Okamura (1998), que se explica por una liberación de sustancias orgánicas no celulósicas en la solución de blanqueado (Wise *et al.*, 1946). Esta liberación podría exponer, de igual forma, la visualización de barbas en los extremos de los fragmentos de túnicas.

El coeficiente de correlación de Spearman o R^2 de 0,9768 en los resultados de espectrofotometría, explica una asociación positiva entre la absorbancia y la concentración. La línea de tendencia estimada en esta prueba, donde la mayor concentración de ácido clorhídrico empleado resulta en una mayor absorbancia, se debe fundamentalmente a una mayor dispersión de las fibras que, en consecuencia, resulta en una mayor absorción de la longitud de onda. Concentraciones menores de ácido clorhídrico empleadas implicaban un mayor tamaño de flóculos o incluso hidrólisis incompletas, aún así, la falta de diferencias estadísticas entre el tamaño de los listones podría deberse principalmente a que la hidrólisis se inicia desde la superficie hacia el interior provocando una disgregación parcial de las fibras más internas y una disgregación más completa para las más expuestas. La hidrólisis realizada a concentración más elevada resultó en una mayor disgregación y la ausencia flóculos, en cambio la concentración menor de ácido produjo fragmentos de túnicas hidrolizados incompletamente. Estudios previos, demuestran que a mayor concentración de ácido, el diámetro de la fibra de tunicina es menor (Tsuchiya y Susuki, 1962, Koo *et al.*, 2002; Habibi *et al.*, 2006) obteniéndose como resultado final con hidrólisis, unidades de glucosa, celobiosa y celotriosa (Tsuchiya y Susuki, 1962). Muchos autores concuerdan, que al utilizar concentraciones de 2,5N de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico entre 48% a 55%, el resultado que se obtiene son “barbas” de tunicina de diámetros cercanos a los 20 nm (Anglès y Dufresne, 2000; Habibi *et al.*, 2006; Elazzouzi-Hafraoui, 2008). La obtención de fibras cercanas a los 360 nm podría deberse a la variabilidad entre las fibras de tunicina

obtenidas de distintas especies, así como la gran resistencia propia de la tunicina con respecto a la celulosa vegetal a las hidrólisis con ácidos concentrados (Tsuchiya y Susuki, 1962). Aún así, aunque los promedios obtenidos de fibras individuales al comparar concentraciones de 2,5N y 2,0N no son estadísticamente significativos, sí existe una leve tendencia a aumentar el diámetro al reducir la concentración de ácido empleado.

Debido a que el diámetro mínimo necesario para la osteoconducción es 100 a 150 μm (Tadic *et al.*, 2004), las fibras obtenidas mediante hidrólisis no cumplían los requisitos básicos para ocupar espacios lo suficientemente grandes para la remoción por calor. Por lo que, mediante la observación individual de los flóculos generados en agua, se consiguió determinar que la concentración de 1,5 N resultaba en diámetros de flóculos más apropiados. Estos flóculos de tunicina en agua luego del tratamiento con HCl, están de acuerdo con lo documentado por Habibi *et al.* (2006). Otros estudios que utilizaron ácido sulfúrico como agente hidrolizante, conllevan a una dispersión de las barbas de manera individual, esto es debido a la formación de grupos sulfatos (Anglès y Dufresne, 2000).

Las varillas obtenidas en agua se forma producto de la interposición superficies lisas muy cercanas entre sí sobre una solución en donde está suspendida la tunicina. Al igual que la formación de flóculos, la producción de varillas en agua se puede entender en parte, por la gran tendencia a la formación de puentes de hidrógeno al utilizar HCl como agente hidrolizante, lo que favorecería la unificación del polímero (Habibi *et al.*, 2006). Por otra parte, al formar varillas en seco se obtuvo un mayor diámetro y más variable entre ellas debido a que no existía una superficie superior que limitara como en el caso de las producidas en agua.

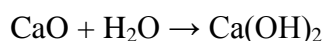
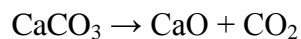
La celulosa presenta una región cristalina que no se altera con la hidrólisis y que puede ser utilizada para el estudio de XRD (Zhao *et al.* 2006). Utilizando este principio se compararon los difractogramas obtenidos de la tunicina y los difractogramas de fibras de algodón obtenidos por Zhao *et al.* (2006). Los picos cristalinos que indican la presencia de celulosa se observan a ángulos 2θ : 22,8, 15,06; 16,38 y un pequeño pico a los 34,15. Esta semejanza confirma que la tunicina está formada por unidades de celulosa (Tsuchiya y Susuki, 1962, Habibi *et al.*, 2006, Elazzouzi-Hafraoui *et al.*, 2008).

Fase de síntesis de HAp.

Para la síntesis de HAp se utilizó como reactivo CaCO_3 obtenido a partir de cáscaras de huevo, debido a que la composición inorgánica de la cáscara de huevo en su mayoría corresponde a calcita (CaCO_3) (Nakano *et al.* 2003 y Chien *et al.*, 2009).

La caracterización por medio de XRD, tanto de la cáscara como de la cáscara sometida a 1200°C , demuestra la presencia de CaCO_3 en su estructura. Los picos obtenidos en la cáscara calcinada a 1200°C coinciden con los picos indicadores de Ca(OH)_2 , en mayor medida, y CaO , en menor medida. Cuando el carbonato de calcio se somete a temperaturas superiores a 900°C se libera CO_2 transformándolo en CaO que posteriormente reacciona con el H_2O ambiental formando Ca(OH)_2 (Blanton y Barnes, 2005).

Las siguientes ecuaciones explican la transformación del CaCO_3 en CaO y la posterior transformación en Ca(OH)_2 .



Ecuación 3. Transformación del CaCO_3 en Ca(OH)_2 .

El análisis de XRD para las muestras de HAp concuerdan con los estándares de HAp sintética e HAp carbonatada comprobando la presencia conjunta de HAp e HAp carbonatada en la muestra. El aumento de intensidad al ángulo 2θ : $20,99$, aunque no aparece en el estándar de HAp, ha sido documentado en HAp sintetizadas a partir de cáscaras de huevo (Rivera-Muñoz *et al.* 2003, Slósarczyk *et al.* 2005).

Una forma de estudiar la presencia de HAp, es la visualización de la forma de los cristales por medio de SEM. Estos varían en forma cristalina o amorfa (Brown *et al.*, 1994). La forma cristalina corresponde a la HAp comercial y se visualiza como láminas pequeñas entrecruzadas, en cambio la forma amorfa corresponde a HAp con alguna sustitución por carbonato (CHAp) (Brown *et al.* 1994). Por sí solo, el SEM sólo permite conocer la morfología pero no confirmar su identificación, pero asociado al XRD permite confirmar la presencia o ausencia de HAp. La figura 13A, revela la coexistencia de las formas cristalina

y amorfa en la HAp sintetizada, lo que está en completa relación con los resultados del XRD.

Fase de producción de un compósito de tunicina e HAp

El reemplazo de la solución acuosa que recibía las gotas de CaCO_3 y ácido fosfórico por una solución que contiene tunicina 0.1% permitió que la tunicina actúe como núcleo de cristalización para la HAp, lo que conlleva a una organización de los cristales (Dalas *et al.* 2000). Esta organización es posible debido a los sitios activos de formación como los grupos funcionales ionizables (-OH) de la celulosa (Dalas *et al.* 2000). El análisis de XRD del compósito mostró picos cristalinos de mayor intensidad a los ángulos 2θ : 11,75 (HAp), 20,97 (Celulosa), 29,12 (HAp o CaCO_3), 30,42 (HAp o CaCO_3), 34,12 (CHAp).

Fase de obtención de HAp con porosidad controlada

En los bloques de HAp porosa se logró distinguir dos tipos de porosidad, microporos interconectados de diámetro cercano a los 2 μm , que se originarían por la descomposición térmica de la celulosa que libera CO_2 que al escapar forma canales al interior de la estructura (Kim *et al.*, 2002), así como también por la sinterización de las fibras individuales de tunicina que se utilizaron en la síntesis de la HAp. Estos microporos han sido documentados previamente en estudios recientes como una característica común a la HAp sometida a más de 900°C (Teixeira *et al.* 2009).

Los canales formados por la microporosidad desembocan en poros de mayor diámetro o macroporos, que superan los 10 μm , que varían dependiendo del procedimiento de formación de las varillas.

En el bloque de HAp porosa formada con las varillas fabricadas en agua, el diámetro de la macroporosidad alcanzó un máximo de 80 μm , insuficiente para la osteoconducción (Tadic *et al.*, 2004). La disminución del tamaño de poros en relación al diámetro obtenido en las varillas en agua, se explica por la propiedad higroscópica de la celulosa que tiene relación directa con los grupos funcionales (-OH) (Taniguchi *et al.* 1978, Hueishing *et al.* 2010). La eliminación del agua asociada a las varillas provocaría una

disminución del diámetro considerable posterior al secado. Sin embargo, al regular la distancia entre las superficies que se utilizaron en la generación de las varillas, podría ser posible producir varillas de mayor diámetro y de esta forma controlar el diámetro de la porosidad final.

Por otra parte, la HAp porosa obtenida con varillas en seco, logró superar el tamaño adecuado para la osteoconducción alcanzando más de 200 μm . Un problema importante en la formación del compósito que generaría la HAp porosa es la diferencia en tamaño y peso de la HAp frente a la tunicina, llevando esta última a acumularse en la parte superior. Como la agregación de las varillas en seco fue posterior a la síntesis y secado, la unión sólo se generó por compactación. Para evitar este proceso, se hizo necesaria la adición de un agente de adhesión como la gelatina, entre la HAp y las varillas de tunicina y de esta forma regular la distribución al interior de la pastilla.

La visualización de la HAp porosa como un conjunto de cristales redondeados fusionados con límites marcados no se condice respecto a la forma de los cristales obtenidos en la síntesis sin calcinación, debido a que la aplicación de calor provoca aglomeración de las partículas de HAp (Thamaraiselvi *et al.* 2006).

Para la HAp que se obtuvo posterior a una calcinación los principales picos de intensidad se situaron en los ángulos 2θ : 31,17 que corresponde HAp, 27,75 de HAp, 43,03 que es compartido entre la HAp y la CHAp y 34,40 que corresponde a HAp. La presencia de 4 picos principales de HAp permite asegurar la existencia de HAp en la muestra. A su vez, la desaparición de los picos relacionados con celulosa se explica por la eliminación total durante la sinterización.

Las bandas a los 3642 y 3571 cm^{-1} en el FT-IR corresponden a grupos ($-\text{OH}$) de la HAp (Teixeira *et al.* 2009, Rehman y Bonfield, 1997) pero que a menudo pueden estar enmascaradas por la absorción de H_2O (Rehman y Bonfield, 1997). Teóricamente, los iones carbonato poseen cuatro modos vibracionales, tres de estos pueden ser observados en el espectro infrarrojo (ν_2 y ν_3) y dos se observan por el espectro de Raman (ν_1 y ν_4) (Rehman

y Bonfield, 1997). Los iones de carbonato ocupan dos sitios diferentes en la apatita carbonatada: picos en la región comprendida entre 1650 a 1300 cm^{-1} debido principalmente a los modos vibracionales ν_3 y el pico a los 873 cm^{-1} producto del modo vibracional ν_2 . Estas bandas de carbonato en la región desde 1650 a 1300 cm^{-1} son asignados a iones carbonato de superficie, más que iones carbonato en la asociación a los iones fosfato. El modo ν_3 posee un pico dividido en dos centrados a 1649 y 1470 cm^{-1} respectivamente con la distribución de los sitios ν_3 del carbonato dependiendo de la maduración y formación de cristales de apatita. La presencia de los modos vibracionales ν_2 y ν_3 del carbonato en la apatita carbonatada puede contribuir a la disminución de los iones hidroxilos en el espectro, así como la banda de hidroxilos presente en el espectro de apatitas carbonatadas es menor en intensidad que la de los polvos de HAp comerciales (Rehman y Bonfield, 1997).

Para los grupos fosfatos también se han descrito 4 modos vibracionales ν_1 , ν_2 , ν_3 y ν_4 , siendo los 4 visibles en el espectro infrarojo tanto de HAp carbonatada como HAp (Rehman y Bonfield, 1997). La banda situada a los 1043 cm^{-1} corresponde al modo ν_3 de la HAp carbonatada, mientras que aquella comprendida entre los 1096 y 1056 cm^{-1} se relaciona con los sitios de la banda ν_3 para la HAp (Rehman y Bonfield, 1997). La banda de absorción a los 961 cm^{-1} es típica de ambos tipos de HAp y corresponde a al modo ν_1 del fosfato (Rehman y Bonfield, 1997). Las bandas situadas entre los 2920 a 2002 cm^{-1} pueden corresponder a grupos fosfatos como ha sido reportado previamente (Teixeira *et al.* 2008). La región comprendida entre los 660 y 520 cm^{-1} puede ser observada también en ambos tipos de HAp, siendo indicadora del modo ν_4 del fosfato (Rehman y Bonfield, 1997). La concordancia entre las bandas de los grupos hidroxilos y fosfatos permiten asegurar la presencia de HAp en las muestras obtenidas.

Los resultados obtenidos en el área de superficie de las muestras de HAp no entregan diferencias estadísticas para ninguno de los grupos. Según los estudios de Texeira *et al.* (2009), el área de superficie de un compuesto de HAp porosa es menor que el área de superficie de una muestra en polvo, presentándose valores de 0.80 m^2/g y 1.87 m^2/g respectivamente. Los estudios del compuesto arrojaron un promedio para la proporción de 80/20 = 0,79 m^2/g y 70/30 = 0,9808 m^2/g que entre sí no exhiben diferencias pero que si se

relacionan con lo reportado en la literatura. La diferencia entre las proporciones 80/20 y 70/30 no fueron suficientes para generar una diferencia estadística, pero si muestran una tendencia a aumentar el área de superficie en la medida que se reduce la proporción de HAp y aumenta la tunicina.

En tanto las mediciones de resistencia arrojaron diferencias estadísticas para la utilización de gelatina individualmente, para las proporciones de HAp y tunicina, así como la asociación de ambas variables. Desde el punto de vista práctico, la HAp con más porosidad es aquella que presenta una menor resistencia mecánica. Nuestros resultados mostraron que a mayor concentración de gelatina se obtiene una mejor distribución de poros y por lo tanto una menor estabilidad mecánica.

BIBLIOGRAFÍA

- **Acevedo-Dávila, J.; López-Cuevas, J.; Vargas-Gutiérrez, G.; Rendón-Ángeles, J.; Méndez-Nonell, J. (2007).** Chemical synthesis of bone-like carbonate hydroxyapatite from hen eggshells and its characterization. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámicas y Vidrio*. 46:225-231.
- **Agarwala, S.; Bhagwat, A. (2005).** Hydroxyapatite as a bone graft substitute: use in cortical and cancellous bone. *Indian Journal of Orthopaedics*. 4:254-256.
- **Anglès, M.; Dufresne, A. (2000).** Plasticized Starch/Tunicin whiskers nanocomposites. 1. Structural analysis. *Macromolecules*. 33:8344-8353.
- **Bandyopadhyay-Ghosh, S. (2008).** Bone as a collagen-hydroxyapatite composite and its Repair. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*. 22:112-120.
- **Blanton, T.; Barnes, C. (2005).** Quantitative analysis of calcium oxide desiccant conversion to calcium hydroxide using X-Ray diffraction. *Advances in X-ray Analysis*. 48:45-51.
- **Brown, B.; Brown, P.; Constantz, B. (1994).** Hydroxyapatite and related materials. *CRC Press*. Danvers. pp. 343.
- **Chien, Y.; Hincke, M.; McKee, M. (2009).** Avian eggshell structure and osteopontin. *Cells Tissues Organs*. 189:39-43.
- **Coates, J. (2000).** Encyclopedia of Analytical Chemistry: Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *John Wiley & Sons Ltd.*, Chichester. pp. 14344.
- **Dalas, E.; Klepetsanis, P.; Koutsoukos, P. (2000).** Calcium carbonate deposition on cellulose. *Journal of Colloid and Interface Science*. 224: 56-62.
- **Droguett, S., (1980).** Determinación de áreas superficiales por el método BET (Brunauer, Emmett y Teller). *Apuntes de clases*. Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Chile, Santiago, Chile. pp. 21.
- **Elazzouzi-Hafraoui, S.; Nishiyama, Y.; Putaux, J.; Heux, L.; Dubreuil, F.; Rochas, C. (2008).** The shape and size distribution of crystalline nanoparticles prepared by acid hydrolysis of native cellulose. *Biomacromolecules*. 9:57-65.

- **Fernández-Tresguerres, I.; Alobera, M.; del Canto, M.; Blanco, L. (2006).** Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. 11:47-51.
- **Habibi, Y.; Chanzy, H.; Vignon, R. (2006).** TEMPO-mediated surface oxidation of cellulose whiskers. *Cellulose*. 13:679-687.
- **Hing, K.; Best, S.; Bonfield, W. (1999).** Characterization of porous hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 10:135-145.
- **Hueishing, S.; Khengten, C. (2010).** The influence of drying temperature on the hygroscopicity of rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *Journal of Agricultural Science*. 2:48-58.
- **Hull, A. (1919).** A new method of chemical analysis. *Journal of the American Chemical Society*. 41:1168–1175.
- **InfoStat (2004).** InfoStat version 2004, *Grupo InfoStat, FCA*, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- **Jensen, D.; Zhongrui L.; Pavel, I.; Dervishi, E.; Biris, A.S.; Jensen, P.; Biris, A.; Lupu, D., (2007).** Bone Tissue: A relationship between micro and nano structural composition and its corresponding electrostatic properties with applications in tissue engineering. *Industry Applications Conference, 2007. 42nd IAS Annual Meeting. Conference Record of the 2007 IEEE*. 55-59.
- **Kieswetter, K.; Schwartz, K.; Dean, D.; Boyan, B. (1996).** The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 7:329-345.
- **Kim, Y.; Kim, S.; Xu, X.; Choi, C.; Park, C.; Kim, H. (2002).** Fabrication of porous preceramic polymers using carbon dioxide. *Journal of Material Science Letters*. 21:1667-1669.
- **Klemm, D.; Schmauder, H.; Heinze, T. (2004).** Biopolymers. Polysaccharides II. Polysaccharides from Eukaryotes. *Cellulose. Wiley InterScience*. pp. 5924.
- **Komlev, V.; Barinov, S.; Orlovskii, V.; Kurdyumov, S. (2001).** Porous ceramic granules of hydroxyapatite. *Refractories and Industrial Ceramics*. 42:195-197.

- **Koo, Y.; Wang, Y.; You, S.; Kim, H. (2002).** Preparation and properties of chemical cellulose from ascidian tunic and their regenerated cellulose fibers. *Journal of Applied Polymer Science*. 85:1634-1643.
- **Martinetti, R.; Dolcini, L.; Mangano, C. (2005).** Physical and chemical aspects of a new porous hydroxyapatite. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 381: 634-638.
- **Nakano, T.; Ikawa, N.; Ozimek, L. (2003).** Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes. *Poultry Science*. 82:510-514.
- **O'Sullivan, A. (1997).** Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*. 4:173-207.
- **Petit, R. (1999).** The use of hydroxyapatite in orthopaedic surgery: a ten-year review. *European Journal of Orthopaedics Surgery and Traumatology*. 9:71-74.
- **Prabakaran, K.; Balamurugan, A.; Rajeswari, S. (2005).** Development of calcium phosphate based apatite from hen's eggshells. *Bulletin of Materials Science*. 28:115-119.
- **Rehman, I.; Bonfield, W. (1997).** Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 8:1-4.
- **Rivera-Muñoz, E.; Curiel, R.; Rodríguez, R. (2003).** Selectivity in the hydroxyapatite synthesis from eggshell using different thermal treatments. *Materials Research Innovations* 7:85-90.
- **Ślósarczyk, A.; Paszkiewicz, Z.; Paluszkiwicz, C. (2005).** FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *Journal of Molecular Structure*. 744: 657-661.
- **Tadic, D.; Beckmann, F.; Schwarz, K.; Epple, M. (2004).** A novel method to produce hydroxyapatite objects with interconnecting porosity that avoids sintering. *Biomaterials*. 25:3335-3340.
- **Taniguchi, T.; Harada, H.; Nakato, K. (1978).** Determination of water adsorption sites in wood by a hydrogen-deuterium exchange. *Nature*. 272:230-231.
- **Taniguchi, T.; Okamura, K. (1998).** New films produced from microfibrillated natural fibres. *Polymer International*. 47:291-294.

- **Teixeira, S.; Rodriguez, M.; Pena, P.; De Aza, A.; De Aza, S.; Ferraz, M.; Monteiro, F. (2009).** Physical characterization of hydroxyapatite porous scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 29: 1510-1514.
- **Thamaraiselvi, T.; Prabakaran, K.; Rajeswari, S. (2006).** Synthesis of hydroxyapatite that mimic bone mineralogy. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*. 19:81-83.
- **Thapon, J., Bourgeois, C. (1994).** L'oeuf et les ovoproduits. *Lavoisier Tee Doc*, Paris. pp. 344.
- **Tsuchiya, Y., Susuki, Y. (1962).** Biochemical studies of ascidean, *Cynthia roretzi* v. *Drasche*. V. Tunicin in test. *Tohoku Journal of Agricultural Research*. 14:39-43.
- **Verde-Carvalho, G.; Guarino, A.; González, G. (2004).** Mineralization of Hydroxyapatite over Collagen Type I. *European Cells and Materials*. 7:58-59.
- **Wise, L., Murphy, M., D'Addieco, A. (1946).** Chlorite Holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses. *Paper Trade Journal*. 122:11-20.
- **Zhao, H.; Kwak, J.; Zhang, C.; Brown, H.; Arey, B.; Holladay, J. (2007).** Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*. 68:235-241.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Difractograma XRD de la tunicina hidrolizada y de celulosa obtenido por Zhao et al. (2006).....	28
Figura 2. Difractograma XRD de la cáscara de huevo y calcita.....	29
Figura 3. Difractograma XRD de la muestra de cáscara de huevo calcinada a 1200 °C.....	30
Figura 4. Difractograma XRD de HAp en polvo, HAp calcinada a 1200 °C y estándar de HAp sintética.....	31
Figura 5. Difractograma XRD del compuesto de HAp y tunicina en polvo.....	32
Figura 6. FT-IR de la HAp calcinada en polvo.....	33
Figura 7. Absorbancia a 400nm para distintas tunicinas obtenidas por hidrólisis con HCl a diferentes concentraciones.....	37
Figura 8. Imágenes SEM de la túnica de <i>Pyura chilensis</i> a 33x, 670x y 1700x.....	38
Figura 9. Imágenes SEM de la túnica de <i>Pyura chilensis</i> posterior al tratamiento de blanqueado a 3300x y 6700x.....	39
Figura 10. Imágenes SEM a 33x de los flóculos de tunicina obtenidos por medio de la hidrólisis 0,5 N, 1,5 N y 2,0 N.....	40
Figura 11. Imágenes SEM de varillas de tunicina obtenidas por medio de fricción en agua a 33x, 1700x, 1700x y 6700x.....	41
Figura 12. Imágenes SEM de varillas de tunicina obtenidas por medio de fricción en seco a 67x y 1700x.....	42
Figura 13. Imágenes SEM de HAp en polvo sintetizada a partir de la cáscara de huevo a 1700x comparadas con dos imágenes de HAp, cristalina y amorfa a 3300x.....	43
Figura 14. Imagen SEM del compuesto de HAp y tunicina a 670x y 3300x.....	44
Figura 15. Imagen SEM de la HAp porosa obtenida utilizando varillas en agua a 670 y 1700x.....	45
Figura 16. Imagen SEM de HAp porosa utilizando el método con varillas en seco a 170x, 670x, 1700x y 6700x.....	46