



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**FACULTADE DE CIENCIAS**

**GRAO EN QUÍMICA**

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Síntese e caracterización de  
biomateriais nanoestructurados aptos  
para a rexeneración ósea**

**Síntesis y caracterización de biomateriales  
nanoestructurados aptos para la regeneración  
ósea**

**Synthesis and characterization of  
nanostructured biomaterials suitable for bone  
regeneration**

Director: Manuel Sánchez Andújar

**Jorge Salgado Beceiro**

Curso 2016/2017 – Convocatoria: Setembro 2017



# Agradecementos:

Ao meu titor, Manolo, pola axuda e todo o que aprendín con el neste Traballo de Fin de Grao.

A todo o persoal do CICA, especialmente ao departamento de QUIMOLMAT, sempre disposto a botar unha man en calquera momento.

A todo o persoal de Develop Biosystem S.L., que me axudou en todo o posible neste Traballo en cada visita que lles fixen en Cedeira.

Á miña familia, especialmente aos meus pais por apoiarme sempre en cada paso que din.

A Marta, que sempre está ao meu lado apoiándome en cada momento.

A tódolos compañeiros de biblioteca en Cedeira, onde redactei este Traballo.



# ÍNDICE

<b>Índice</b> .....	5
<b>1. Resumo/Resumen/Abstract</b> .....	1
1.1. Resumo .....	1
1.2. Resumen .....	2
1.3. Summary .....	3
<b>2. Abreviaturas</b> .....	4
<b>3. Introducción</b> .....	5
3.1. Biomateriais .....	5
3.2. Biomateriais cerámicos .....	8
3.2.1. Fosfato cálcico bifásico (BCP) .....	9
3.3. Unión da biocerámica ao medio biolóxico .....	12
3.3.1. Piezoelectricidade .....	12
3.3.2. Coláxeno .....	13
3.3.3. Óxido de sílice (SiO <sub>2</sub> ) .....	14
3.3.4. Titanato de bario (BaTiO <sub>3</sub> ) .....	15
<b>4. Obxectivos</b> .....	17
<b>5. Parte experimental</b> .....	18
5.1. Síntese de SiO <sub>2</sub> mesoporoso .....	18
5.1.1. Reaccións xerais .....	18
5.1.2. Reactivos .....	18
5.1.3. Material e montaxe .....	19
5.1.4. Procedemento experimental .....	19
5.2. Síntese de nanopartículas de BaTiO <sub>3</sub> .....	20
5.2.1. Reactivos .....	20
5.2.2. Material e montaxe .....	21
5.2.3. Procedemento experimental .....	21
5.3. Síntese do BCP .....	21
5.3.1. Síntese do precursor CDHA .....	21
5.3.1.1. Reaccións xerais .....	22

5.3.1.2. Reactivos.....	22
5.3.1.3. Material e montaxe .....	22
5.3.1.4. Procedemento experimental.....	23
5.3.2. Síntese de BCP a partir de CDHA.....	24
5.3.2.1. Reaccións xerais.....	24
5.4. Conformado poroso dos materiais .....	25
5.4.1. Conformado poroso do BCP .....	25
5.4.2. Preparación dos materiais compostos BCP-SiO <sub>2</sub> e BCP-BaTiO <sub>3</sub> e o seu conformado poroso .....	26
<b>6. Instrumental e métodos .....</b>	<b>27</b>
6.1. Caracterización por difracción de Raios X .....	27
6.2. Caracterización por Espectroscopía IR.....	28
6.3. Caracterización por microscopía electrónica .....	29
6.3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	30
6.3.2. Microscopía electrónica de Transmisión (TEM).....	31
6.4. Análise termogravimétrica (TGA) .....	32
<b>7. Resultados e discusión .....</b>	<b>33</b>
7.1. Caracterización de BCP, SiO <sub>2</sub> mesoporoso e BaTiO <sub>3</sub> .....	33
7.1.1. Caracterización de BCP.....	33
7.1.1.1. Caracterización de BCP por TGA .....	33
7.1.1.2. Caracterización de BCP por DRX .....	34
7.1.1.3. Caracterización de BCP por espectroscopía IR .....	35
7.1.2. Caracterización de SiO <sub>2</sub> mesoporoso .....	36
7.1.2.1. Caracterización de SiO <sub>2</sub> mesoporoso por espectroscopía IR.....	36
7.1.2.2. Caracterización de SiO <sub>2</sub> mesoporoso por espallamento de Raios X de baixo angulo .....	37
7.1.2.3. Caracterización morfolóxica de SiO <sub>2</sub> mesoporoso mediante TEM.....	38
7.1.3. Caracterización de BaTiO <sub>3</sub> .....	39
7.1.3.1. Caracterización de BaTiO <sub>3</sub> por DRX .....	39
7.1.3.2. Caracterización morfolóxica de BaTiO <sub>3</sub> mediante TEM.....	40
7.2. Caracterización dos materiais con morfoloxia porosa .....	41
7.2.1. Caracterización do conformado de BCP poroso .....	41

7.2.1.1.	Caracterización do polímero poroso por espectroscopía IR .....	41
7.2.1.2.	Caracterización de CDHA + polímero estrutural mediante TGA.....	42
7.2.1.3.	Caracterización morfolóxica do conformado de BCP mediante microscopía óptica e SEM.....	43
7.2.2.	Caracterización do conformado BCP-SiO <sub>2</sub> .....	44
7.2.2.1.	Caracterización do conformado BCP-SiO <sub>2</sub> por DRX.....	44
7.2.2.2.	Caracterización morfolóxica do conformado BCP-SiO <sub>2</sub> mediante microscopía óptica.....	45
7.2.3.	Caracterización de BCP + BaTiO <sub>3</sub> .....	46
7.2.3.1.	Caracterización de BCP + BaTiO <sub>3</sub> por DRX .....	46
7.2.3.2.	Caracterización morfolóxica do conformado BCP-BaTiO <sub>3</sub> mediante microscopía óptica.....	47
7.3.	Outros ensaios .....	48
<b>8.</b>	<b>Conclusións/Conclusiones/Conclusions .....</b>	<b>50</b>
8.1.	Conclusións .....	50
8.2.	Conclusiones .....	51
8.3.	Conclusions .....	52
<b>9.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>53</b>





# 1. RESUMO/RESUMEN/ABSTRACT

## 1.1. Resumo

Neste Traballo de Fin de Grao estudouse a síntese por vía húmida de fosfato cálcico bifásico (formado por hidroxiapatita e  $\beta$ -fosfato tricálcico).

Leváronse a cabo tamén as sínteses de óxido de sílice mesoporoso e de nanopartículas de titanato de bario para a súa posterior adición, por separado, ao fosfato cálcico bifásico, coa fin de variar as propiedades do material biocerámico de cara a favorecer a capacidade de osteoinducción e a integración do biomaterial no medio biolóxico.

A caracterización dos materiais sintetizados fíxose mediante as técnicas de: espectrometría infravermella por transformada de Fourier (FTIR), difracción de raios X de po (DRX), microscopía óptica, microscopía electrónica de varrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) e análise termogravimétrica (TGA).

Como resultado, sintetizouse o BCP coa composición, estrutura e morfoloxías desexadas, así como o  $\text{SiO}_2$  mesoporoso, as nanopartículas de  $\text{BaTiO}_3$  e os compostos de BCP- $\text{SiO}_2$  e BCP- $\text{BaTiO}_3$ , tamén coa composición, estrutura e morfoloxías desexadas, polo que se espera que sexan aptos para poder incorporarse ao tecido biolóxico e favorecer a rexeneración ósea.

## 1.2. Resumen

En este Trabajo de Fin de Grado se estudió la síntesis por vía húmeda de fosfato cálcico bifásico (formado por hidroxiapatita y  $\beta$ -fosfato tricálcico).

Se llevaron a cabo también las síntesis de óxido de silicio mesoporoso y de nanopartículas de titanato de bario para su posterior adición, por separado, al fosfato cálcico bifásico, con el fin de variar las propiedades del material biocerámico de cara a favorecer la capacidad de osteoinducción y la integración del biomaterial en el medio biológico

La caracterización de los materiales sintetizados se hizo mediante las técnicas de: espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X de polvo (DRX), microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y análisis termogravimétrico (TGA).

Como resultado, se sintetizó el BCP con la composición, estructura y morfologías deseadas, así como el  $\text{SiO}_2$  mesoporoso, las nanopartículas de  $\text{BaTiO}_3$  y los compuestos de BCP- $\text{SiO}_2$  y BCP- $\text{BaTiO}_3$ , también con la composición, estructura y morfologías deseadas, por lo que se espera que sean aptos para poder incorporarse al tejido biológico y favorecer la regeneración ósea.

### 1.3. Summary

In this Final Grade Project, it was studied the synthesis of biphasic calcium phosphate (formed by hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate) by a wet method.

Additionally, it was synthesized mesoporous silicon dioxide and barium titanate to be added, separately, to the biphasic calcium phosphate, with the purpose of varying the properties of the bioceramic material for favour its osteoinduction capacity and the integration of the biomaterial in the biologic medium.

The characterization of the synthesized materials was carried out by the techniques of: Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), powder X-Ray diffraction (XRD), optical microscopy, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron spectroscopy (TEM) and thermogravimetric analysis (TGA).

As a result, BCP, mesoporous  $\text{SiO}_2$ , nanoparticles of  $\text{BaTiO}_3$  and the composite materials of BCP- $\text{SiO}_2$  and BCP- $\text{BaTiO}_3$  were synthesized with the suitable composition, structure and morphology, so it's expected that they would be suitable to be incorporated in the biological tissue and to favour the bone regeneration.

## 2. ABREVIATURAS

**BCP** – Fosfato Cálcico Bifásico

**TCP** –  $\beta$ -Fosfato Tricálcico

**HA** – Hidroxiapatita

**PEG** – Polietilenglicol

**PVP** - Polivinilpirrolidona

**OPr**- Isopropóxido

**acac**– Acetilacetato

**DCPD** – Fosfato Dicálcico Dihidratado

**CDHA** – HA deficiente en calcio

**TEOS** – Tetraetil Ortosilicato

**CTAB** – Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio

**FTIR** – Espectroscopía Infravermella con Transformada de Fourier

**ATR** – Reflectancia Total Atenuada

**SEM** – Microscopía Electrónica de Varrido

**TEM** – Microscopía Electrónica de Transmisión

**TGA** – Análise Termogravimétrica

**DRX** – Difracción de Raios X

### 3. INTRODUCCIÓN

Neste Traballo de Fin de Grao estudarase a síntese dun biomaterial cerámico, en concreto o fosfato cálcico bifásico (BCP), que terá un uso terapéutico na rexeneración ósea. Trataranse de optimizar as características relacionadas con esta actividade biolóxica de forma que a rexeneración ósea sexa o máis favorable posible. Con este obxectivo, prepáranse materiais compostos de BCP e  $\text{SiO}_2$  ou  $\text{BaTiO}_3$ . Estes dous compostos serán utilizados coa fin de mellorar a capacidade de osteoinducción do BCP. A elección destes dous compostos cerámicos,  $\text{SiO}_2$  e  $\text{BaTiO}_3$ , vén dada primeiramente por seren materiais con propiedades piezoeléctricas, xa que as biocerámicas naturais presentan un compoñente, o coláxeno, que presenta dita propiedade. Ademais, estudos recentes indican que esta propiedade favorece proliferación das células óseas na superficie da biocerámica.

A continuación, farase unha breve introdución ao que son os biomateriais, especialmente as biocerámicas, e falarase tamén neste apartado da piezoelectricidade e dos compostos que a presentan.

#### 3.1. Biomateriais

Actualmente existen moitas definicións do que é un biomaterial. Para este traballo tomaremos a dada por M. Vallet Regí no seu libro *Biomateriales*. Como biomaterial defínese aquel material que se pode implantar nun organismo vivo, cunha orixe que pode ser tanto natural coma artificial. O seu uso pode ser diverso, dende a reparación de tecido danado, ata a rexeneración dun tecido ou incluso a súa substitución.<sup>1</sup>

A aparición dos biomateriais na historia supuxo un avance científico moi importante. O seu obxectivo principal é a mellora da calidade de vida das persoas e aumentar a súa esperanza de vida. Esta lonxevidade xera un gran aumento na demanda de biomateriais, o que implica que serán necesarios cada vez máis dispositivos biomédicos fabricados con biomateriais.

Na actualidade, máis de cincuenta millóns de persoas teñen implantada algún tipo de prótese, dato que informa do presente que está na sociedade a industria dos

biomateriais. É por isto que acabou xurdindo na comunidade científica a disciplina científico-tecnolóxica da Ciencia dos Biomateriais.

Aínda que a disciplina se coñeza con este nome de maneira recente, o uso de biomateriais é moito máis anterior, e para chegar aos primeiros biomateriais hai que ir ata fai miles de anos antes da actualidade.

Fai uns anos, en Washington (EEUU), atopáronse os restos dun ser humano coñecido coma “O Home de Kennewick”, datados en fai nove mil anos. Foi descrito coma unha persoa alta, saudable e activa, e que era capaz de vivir cunha punta de frecha incrustada na súa cadeira. Este implante non desexado amosa a capacidade do corpo humano para relacionarse con materiais estraños.



Figura 1 Dentes unidos con arame de ouro, Exipto, fai 4000 anos

Fai dous mil anos, os fenicios, exipcios, etruscos, chinos e aztecas xa utilizaban o ouro en cirurxía dental, véxase Figura 1.

Os implantes e dispositivos médicos máis empregados na historia foron os ollos de vidro e os dentes de madeira.

No século XIX comezaron a facerse estudos sobre a compatibilidade con diversos materiais (prata, ouro, platino, chumbo, aceiro) e é onde xorden as primeiras prácticas do que sería a cirurxía moderna.

Xa no século XX comeza a traballarse con aceiros inoxidables, así coma diversas aliaxes, entre elas as de base de cobalto en ortopedia, que se converterían nas máis populares en dito campo. Naceron tamén neste século os primeiros implantes de vidro que acabaríanse convertendo, tras varias melloras do biomaterial, nos utilizados nas operacións de cataratas.

No mundo actual as aplicacións de biomateriais están presentes en gran cantidade de campos dentro da medicina, dende tratamento de ósos ata o de distintos órganos do sistema cardiovascular, sistema nervioso, etc. <sup>2</sup>

No seguinte cadro pódense ver varios exemplos de biomateriais empregados en distintas áreas:

<b>Aplicación</b>	<b>Material empregado máis frecuente</b>
<b>Sistema óseo</b>	
Substitución de articulacións	Aliaxes de titanio, aceiro inoxidable, polietileno
Placas para fixación de fracturas	Aceiro inoxidable, aliaxes cobalto-cromo
Cemento para ósos	Polimetilmetacrilato
Reparación de defectos óseos	Hidroxiapatita
Ligamentos e tendóns artificiais	Teflón, Macrón
Implantes dentais	Titanio, alúmina, fosfato cálcico
<b>Sistema cardiovascular</b>	
Próteses vasculares	Dacrón, Teflón, poliretano
Válvulas de corazón	Tecido reprocessado, aceiro inoxidable, Dacrón
Catéter	Goma de silicona, Teflón, poliuretano
<b>Órganos</b>	
Corazón artificial	Poliuretano
Placas de reparación de pel	Materiais de silicona-coláxeno
Ril artificial (hemodiálise)	Celulosa, poliacrilonitrilo
Respiradores artificiais	Goma de silicona
<b>Sentidos</b>	
Lentes intraoculares	Polimetilmetacrilato, goma de silicona
Lentes de contacto	Silicona-acrilato, hidroxeles

Unha vez se ten falado da historia dos biomateriais, pasaranse a analizar os tipos e propiedades dos biomateriais.

A consideración do sitio anatómico onde se vai localizar un implante fai xurdir unha serie de desafíos á hora de desenrolar un material, xa que segundo o lugar e a función do dispositivo, haberá uns requisitos ou outros.

En canto ás propiedades mecánicas, dependerán do tipo de dispositivo a facer. Unha prótese dun óso debe ser forte e ríxida; sen embargo se hai que substituír un tendón, o biomaterial debe ser forte e flexible; unha válvula de corazón debe ser flexible e duradeira no mesmo tempo.

A durabilidade do material tamén pode ser moi variable. Un catéter só debe durar 3 días, unha placa de fixación de ósos debe ser funcional ao menos durante 6 meses; unha válvula de corazón debe poder flexionar 80 veces por minuto sen romper, toda a vida do paciente.

As propiedades relacionadas co volume tamén son moi variables. Unha membrana de diálise debe ter unha permeabilidade específica. Unha copa acetabular da articulación de cadeira debe ter lubricidade.

Todo isto leva a que para a construción dun biomaterial hai que ter en conta tódolos factores químicos, físicos e mecánicos aos que se verá sometido na súa utilización.

Segundo a variación das propiedades dependendo da composición dos biomateriais, estes poden organizarse en varios tipos pola súa natureza:

- Metálicos: titanio e aliaxes, aceiro inoxidable...
- Poliméricos: polietilenglicol (PEG), policaprolactona (PCL)
- Cerámicos: hidroxapatita, vidros bioactivos...
- Materiais compostos "*composites*": empastes (cerámica-polímero), cementos reforzados...<sup>3</sup>

Xa que o presente Traballo de Fin de Grao está baseado na síntese dun biomaterial cerámico, a introdución centrarase neste grupo de biomateriais.

## **3.2. Biomateriais cerámicos**

Os biomateriais cerámicos están constituídos por compostos inorgánicos que conteñen elementos metálicos e non metálicos, unidos por enlaces iónicos ou covalentes, formados xeralmente a altas temperaturas.

Un dos subgrupos das cerámicas, e co que traballaremos neste traballo, son as cerámicas porosas, utilizadas na rexeneración ósea. Unha das vantaxes que presentan é a combinación de que sexan inertes xunto coa súa estabilidade mecánica que desenrola cando as células crecen por en medio dos poros.

As cerámicas resultan moi útiles coma biomateriais debido ás vantaxes que presentan:



- Son inertes no medio fisiolóxico.
- Son moi resistentes ao desgaste.
- Teñen moita resistencia á compresión.

As biocerámicas utilízanse hoxe en día na rexeneración do tecido óseo, aínda que a súa aplicación está centrada máis ben en dispositivos que non teñan que soportar grandes cargas, como é o caso de recheos óseos en cirurxía bucal e ortopédica.

Anque as cerámicas non sofren corrosión, si presentan certa solubilidade ao expoñerse á solución salina do medio biolóxico.

Xa que os biomateriais cerámicos son utilizados principalmente na rexeneración ósea, o éxito de esta aplicación depende directamente de xerar unha boa conexión entre a cerámica e o tecido conectivo. Para que a cerámica sexa aceptada de forma que a rexeneración sexa favorable, débense cumprir dous feitos principais:

- Que o material non sexa tóxico para que o tecido circundante non morra.
- Que sexa biolóxicamente activo. De non selo, formarase un recubrimento fibroso ao redor del.

Dentro das biocerámicas máis utilizadas na rexeneración de tecido óseo están a hidroxiapatita (HA) e o  $\beta$ -fosfato tricálcico (TCP), xa que liberan os ións de calcio e fosfato que requiren as celas rexeneradoras de óso. Un medio rico en ditos ións favorecerá a rexeneración do óso. Nesta investigación estudarase a síntese dun composto formado por ambos compostos, no que estean presentes as dúas fases, o fosfato cálcico bifásico (BCP).<sup>3</sup>

---

### **3.2.1. Fosfato cálcico bifásico (BCP)**

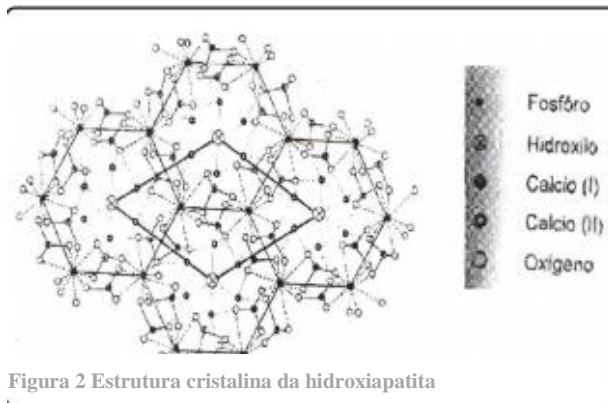
O fosfato cálcico bifásico é a cerámica máis adoitada para a rexeneración ósea. Está composta por hidroxiapatita (HA) e o  $\beta$ -fosfato tricálcico (TCP). As velocidades de solubilidade do TCP son maiores no organismo que as da HA, por iso a HA servirá máis ben coma soporte mecánico duradeiro e o TCP coma liberador de ións. Tratarase de sintetizar un BCP que teña poros a nivel da orde de 100nm e, por outro lado, que teña tamén macro poros, da orde de 500 $\mu$ m, de forma que teña unha porosidade similar á dun óso natural.

## 1. Hidroxiapatita:

A hidroxiapatita é un fosfato cálcico con fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (dúas unidades fórmula por cela unidade), cunha relación Ca/P de 1.67. Atópase de forma natural en ósos e dentes. <sup>4,5</sup>

De forma natural, a HA é deficiente en calcio ( $\text{Ca/P} < 1.67$ ) e presenta outros ións substituindo ao calcio na estrutura, que poden ser magnesio, sodio, potasio, estroncio ou zinc. O ión fosfato pode estar tamén substituído por carbonato, sulfato, etc..

As HA sintéticas, obtidas a partir de fosfatos dicálcicos e tricálcicos participan no corpo coma estrutura interna e son bioloxicamente equivalentes ás naturais, dado que induce a mesma resposta celular. <sup>6</sup>



A HA presenta una estrutura hexagonal, con el grupo espacial  $\text{P6}_3/\text{m}$ , véxase Figura 2. <sup>8</sup>

A HA ten unha solubilidade baixa en fluídos biolóxicos, de aí a súa boa funcionalidade estrutural. A HA é un material moi resistente, ten un módulo de Young de entre 80 e 110 GPa, ademais dunha elevada resistencia á compresión de entre 400 e 900 GPa.

## 2. $\beta$ -Fosfato tricálcico (TCP):

O TCP é un fosfato cálcico de fórmula  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  e uha relación Ca/P de 1.50. <sup>4,5</sup>

O TCP pode presentar tres estruturas (polimorfos) dependendo da temperatura:

- $\beta$ -TCP, estable ata 1120-1170°C.
- $\alpha$ -TCP, ao sobrepasar os 1120-1170°C.
- Super  $\alpha$ -TCP, que só é estable ao superar os 1430°C. <sup>4,5</sup>

Debido á súa estabilidade química, resistencia mecánica e alta taxa de reabsorción, o polimorfo utilizado coma biocerámica é o  $\beta$ -TCP. O feito de que o TCP sexa máis soluble que a HA nos fluídos biolóxicos fai que a súa combinación coa apatita favoreza moito a rexeneración ósea, xa que a HA aporta o andamiaxe do biomaterial e o TCP libera ións ao medio para crear un ambiente idóneo para a rexeneración do óso.<sup>9</sup>

A estrutura do TCP é romboédrica, cun grupo espacial R3c e cuns parámetros de cela unidade de  $a=10.439 \text{ \AA}$  e  $c=37.375 \text{ \AA}$ , presentando 21 unidades fórmula por cada cela unidade hexagonal.<sup>5</sup>

### 3. Fosfato cálcico bifásico (BCP):

Dadas as distintas propiedades do TCP e da HA, a combinación de ámbolos dous nun composto bifásico forma o composto ideal para utilizar no campo da rexeneración ósea. Isto débese a que a HA aporta a estrutura do biomaterial e o TCP libera ao medio os ións que fan propicia a rexeneración ósea.

A síntese por vía húmida do BCP é a máis habitual para obter o composto, xa que permite un bo control das características microestruturais (tamaño de partícula, tamaño de poro, etc.). Pero o máis importante é que mediante esta síntese, as dúas fases de HA e TCP quedan mezcladas de forma homoxénea.

No proceso de síntese pártese dun precursor, HA deficiente en calcio (DCPD), cunha  $\text{Ca/P} < 1.67$ . Tras producirse a reacción por vía húmida, o produto trátase térmicamente e parte da cerámica obtida convértese en HA e outra parte en TCP, véxase Figura 3.

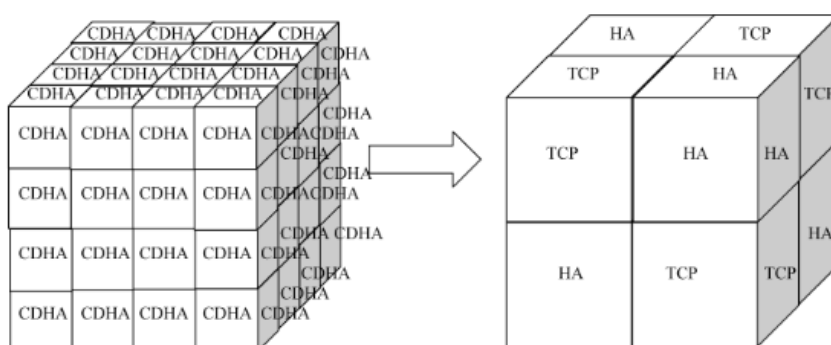


Figura 3 Transformación de DCPD en BCP



### 3.3. Unión da biocerámica ao medio biolóxico

A unión do biomaterial cerámico ao medio biolóxico dependerá de diversos factores que abarcan dende a biocompatibilidade, toxicidade ou degradación do biomaterial ata outro tipo de propiedades da biocerámica. A compatibilidade biolóxica, así coma a toxicidade do BCP coñécense e sábese que é un material biocompatible que non resulta tóxico para o organismo. Neste apartado comentarase unha das propiedades que pode afectar á unión do biomaterial ao entorno biolóxico, a piezoelectricidade.

#### 3.3.1. Piezoelectricidade

A piezoelectricidade é unha propiedade que presentan certos materiais. O efecto piezoeléctrico describe a relación entre unha tensión mecánica e unha voltaxe eléctrica en sólidos. É a capacidade de certos materiais para producir unha carga eléctrica en resposta a un esforzo mecánico aplicado, véxase Figura 4 (representación do efecto piezoeléctrico)

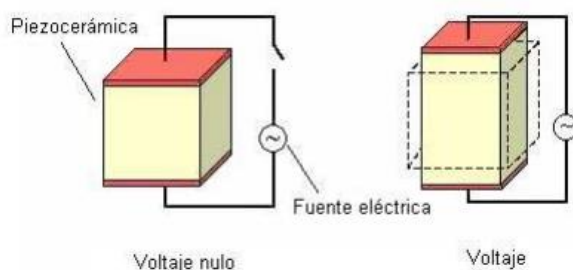


Figura 4 Efecto piezoeléctrico

A piezoelectricidade foi descuberta en 1880 por Jacques e Pierre Curie. Descubriron que cando se aplicaba unha tensión a certos cristais como a turmalina, o cuarzo, o topacio e a sal Rochelle, xerábase unha carga eléctrica, e a súa voltaxe era proporcional á tensión aplicada.<sup>11</sup>

Alguns materiais biolóxicos teñen unha orientación polar uniaxial dos dipolos na súa estrutura molecular e poden ser considerados coma bioeléctricos. Ditos materiais poden ser piezoeléctricos. Un exemplo destes materiais é o coláxeno. O coláxeno goberna as propiedades biomecánicas e a integridade funcional dos ósos. A piezoelectricidade do coláxeno óseo e súa influencia na fisioloxía e funcionalidade do óso foi altamente

estudada. Sen embargo, o proceso de mineralización foi atribuído fundamentalmente á actividade dos osteoblastos (rexeneradores de óso), os cales son atraídos electricamente polos dipolos xerados polo efecto piezoeléctrico. <sup>12</sup>

Dados estes feitos de mellora da actividade dos osteoblastos ao seren atraídos polo efecto piezoeléctrico, neste presente traballo estudarase a adición de materiais cunha relativamente alta piezoelectricidade á rede de BCP que se vai sintetizar. Estudaranse, por separado, as sínteses de óxido de sílice (SiO<sub>2</sub>) mesoporoso e de nanopartículas de titanato de bario (BaTiO<sub>3</sub>) e a súa adición, tamén por separado, a unha rede de BCP.

### 3.3.2. Coláxeno

Os ósos naturais están formados por unha parte cerámica composta por HA natural, depositada sobre unha matriz extracelular composta nun 90% de coláxeno.

O coláxeno é a proteína extracelular máis abundante en animais e existen ata 21 tipos diferentes. O coláxeno tipo 1 é o que se atopa en ósos e tendóns e ten unha estrutura de triple hélice (procoláxeno) dextróxima de lonxitude aproximada a 300 nm e un diámetro de aprox 1.5 nm, véxase Figura 5.

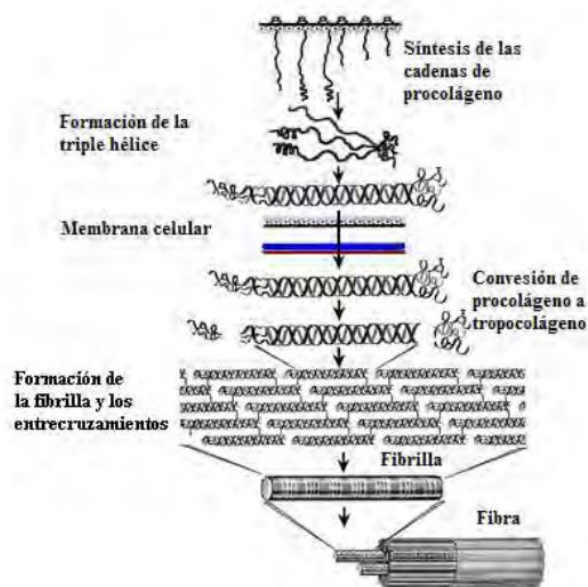


Figura 5 Formación de coláxeno

A alta organización fibrilar do coláxeno proporcionalle un momento dipolar permanente (unha polaridade diferente en cada extremo) e ten a capacidade de orientar as cargas baixo unha deformación mecánica, o que se coñece coma piezoelectricidade. Este

fenómeno fomenta a interacción iónica da fase inorgánica coa orgánica. Esta separación permanente das cargas na molécula de coláxeno permítelle interactuar electrostaticamente con ións do fluído extracelular (calcio, fosfato) e nuclear cristais de HA nos ósos, outorgando resistencia mecánica. <sup>13</sup>

### 3.3.3. Óxido de sílice (SiO<sub>2</sub>)

O óxido de sílice é un material cerámico de fórmula SiO<sub>2</sub> que pode ser cristalino ou amorfo. A temperatura e presión ambiental a forma existente do SiO<sub>2</sub> é a do  $\alpha$  cuarzo, que ten estrutura trigonal, véxase Figura 6.

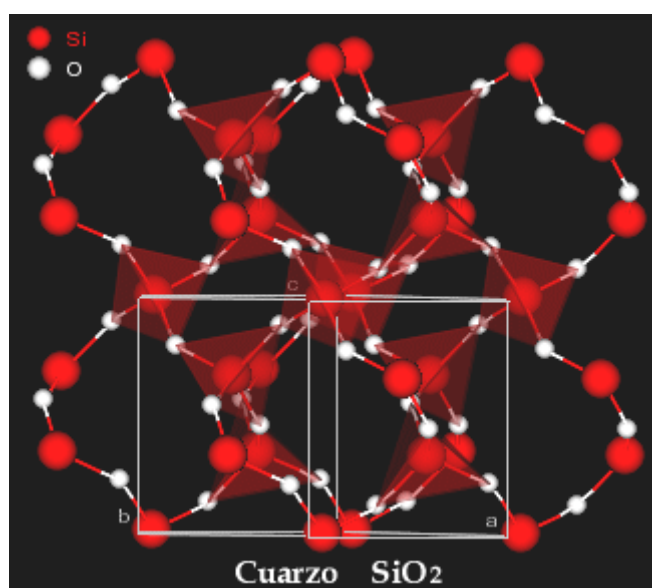


Figura 6 Estrutura do alfa cuarzo

Como o material a sintetizar vai ser unha biocerámica porosa que simule a porosidade dun óso natural, interesa que a porosidade sexa alta. É por isto que estudárase a síntese de óxido de sílice mesoporoso. É tamén un material moi duro, o que encaixa dentro das propiedades desexadas do biomaterial a sintetizar, xa que aportará consistencia á rede. Como é un material cunha alta piezoelectricidade, espérase que esta propiedade sexa favorecedora da rexeneración ósea.

O dióxido de silicio mesoporoso, coñecido tamén como Mobil Composition of Matter Nº. 41 (MCM-41), foi descuberto en 1992 e dende entón fixéronse multitude de estudos sobre el, chegando á súa aplicación da medicina. O tamaño de poro é de entre 2 e 50

nm. Búscase que o tamaño de poro sexa de tan pequeno tamaño para que a liberación dos ións  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  sexa modulada.

Ademais, na superficie do  $\text{SiO}_2$  mesoporoso fórmase unha capa de grupos silanol ( $\text{SiOH}$ ), que reaccionan con fluídos corporais xerando unha capa de hidroxicarbonato apatita, formada por cristais nanométricos, o cal facilita a unión ao óso natural. Este fenómeno coñécese coma comportamento bioactivo das nanopartículas.

Para a síntese do óxido de sílice mesoporoso séguese o método sol-xel, cun sulfatante que aporte a morfoloxía porosa desexada (nanopartículas de  $\text{SiO}_2$ ).<sup>14</sup>

Faise reaccionar TEOS (tetrametilortosilicato) en medio acuoso con amoníaco e engádesse CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) coma sulfatante.<sup>15</sup>

### 3.3.4. Titanato de bario ( $\text{BaTiO}_3$ )

O titanato de bario  $\text{BaTiO}_3$  é un material cerámico con estrutura tipo perovskita, (véxase Figura 7).

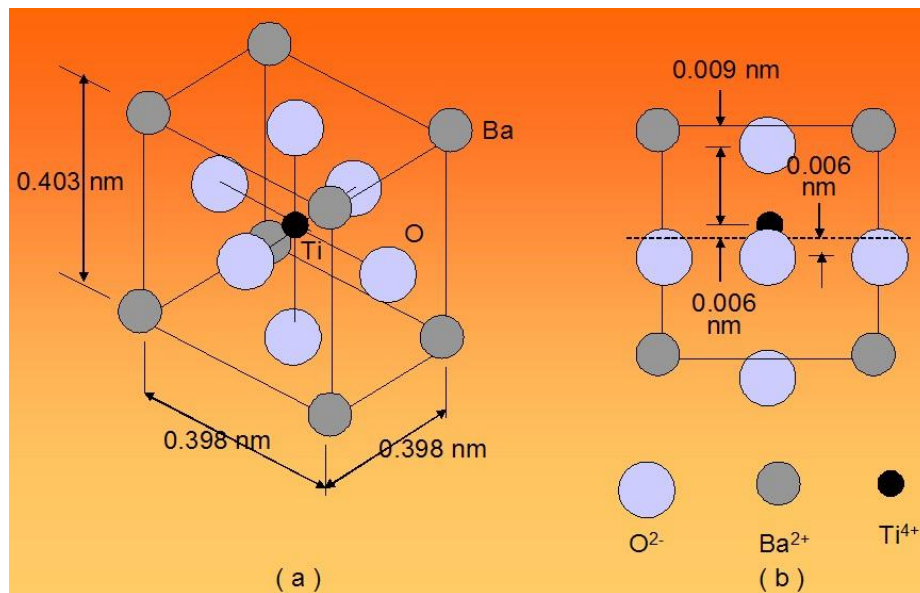


Figura 7 Estrutura cristalina do titanato de bario

Ao igual que o óxido de sílice, o titanato de bario é un material cunha alta piezoelectricidade e, ademais, presenta unha alta dureza que axudará a dar máis consistencia á biocerámica a sintetizar.

Para introducir o titanato de bario na rede do BCP, sintetizaranse nanopartículas de titanato. Para facelo, seguirase unha vía non acuosa, mediante un proceso sinxelo nun único recipiente. O método consiste na disolución de acetilacetato de bario en alcohol bencílico e o posterior tratamento térmico da disolución resultante.<sup>16</sup>



## 4. OBXECTIVOS

O obxectivo principal deste traballo de fin de grao é a preparación dun material biocerámico, en concreto o fosfato cálcico bifásico (BCP), onde se melloraron as súas propiedades de osteoinducción, mediante unha morfoloxía porosa e a adición de materiais piezoeléctricos nanoestruturados.

Na realización deste obxectivo realizáronse as seguintes tarefas:

- Busca bibliográfica sobre biomateriais cerámicos (morfoloxía, estrutura, propiedades, aplicacións, síntese), en especial sobre o BCP, o  $\text{SiO}_2$  e o  $\text{BaTiO}_3$ .
- Busca bibliográfica sobre materiais piezoeléctricos e súa integración con tecido biolóxico.
- Síntese, por vía húmida de BCP partindo de HA deficiente en Ca.
- Síntese de  $\text{SiO}_2$  mesoporoso, coñecido como MCM-41, polo método sol-xel cun "surfactante".
- Síntese de nanopartículas de  $\text{BaTiO}_3$  por unha ruta libre de haloxenuros.
- Preparación de materiais compostos de BCP/ $\text{SiO}_2$  e BCP/ $\text{BaTiO}_3$ .
- Conformado dos materiais biocerámicos BCP, BCP/ $\text{SiO}_2$  e BCP/ $\text{BaTiO}_3$  morfoloxía porosa empregando como "andamiaxe" ou "*scaffold*" diferentes polímeros.
- Caracterización morfolóxica e estrutural de tódolos materiais polas técnicas de espectrometría infravermella por transformada de Fourier (FTIR), difracción de raios X de po (DRX) e microscopía electrónica de varrido (SEM) e transmisión (TEM) e análise termogravimétrica

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

Neste apartado explicarase a preparación dos diferentes materiais deste traballo, comezando coas sínteses de SiO<sub>2</sub> mesoporoso e de nanopartículas de BaTiO<sub>3</sub> e seguidamente a síntese de BCP puro e materiais compostos de BCP nos que se incorporarán os compostos sintetizados anteriormente.

### 5.1. Síntese de SiO<sub>2</sub> mesoporoso

Realizouse a síntese de óxido de sílice (SiO<sub>2</sub>) mesoporoso tipo MCM-41 mediante o método descrito por Cai et al e colaboradores. A síntese consiste nun método sol-xel cun "surfactante" ou tensoactivo que forma micelas no medio de reacción e estas actúan como "andamiaxe" para acadar a morfoloxía porosa desexada (nanopartículas de SiO<sub>2</sub> mesoporoso).<sup>15</sup>

#### 5.1.1. Reaccións xerais

A reacción que se produce é a do tetraetil ortosilicato (TEOS) con auga para dar o SiO<sub>2</sub> coñecese como reacción ou proceso de Stöber.<sup>17</sup>



#### 5.1.2. Reactivos

- Tetraetil ortosilicato (TEOS) ACROS ORGANICS (98%)
- Amoníaco (NH<sub>3</sub>) Panreac (30%)
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) Sigma-Aldrich (98%)

Composto	V(mL)	m(mg)
H <sub>2</sub> O	150	
NH <sub>3</sub>	70	
TEOS		0.7396
CTAB	3.5	

---

### 5.1.3. Material e montaxe

- Matraz de fondo redondo (250mL)
- Placa calefactora IKA RTC Basic con sonda
- Pinzas e noz
- Soporte
- Barra axitadora
- Vidro de reloxo
- Micropipeta (5000 $\mu$ L)
- Probeta (100mL)
- Tubos de silicona
- Material filtración a baleiro

Montaxe (véxase Figura 8):

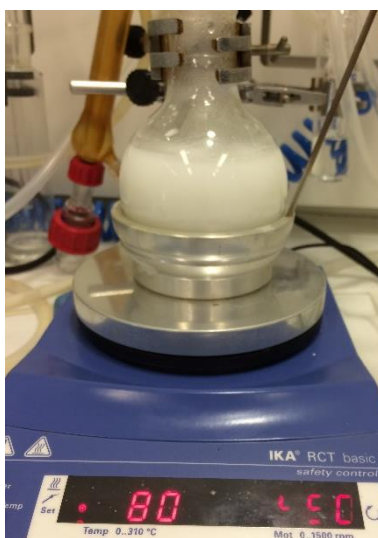


Figura 8 Montaxe da síntese de SiO<sub>2</sub> mesoporoso

---

### 5.1.4. Procedemento experimental

Nun matraz de fondo redondo de 250 mL vértense 70 mL de NH<sub>3</sub> (30%) e 150 mL de auga destilada. Axítase a 450 rpm e quéntase a 80°C. Nestas condicións de temperatura e axitación engádense 0.7396 g de CTAB (98%), que actuará coma surfactante. Unha vez disolto o CTAB engádense, gota a gota, 3.5mL de TEOS. Déixase reaccionar 2 horas.

Unha vez frío, fíltrase a baleiro e lávase varias veces con auga. Sécase o precipitado a 110°C 24 horas e logo calcínase 4 horas a 510°C.

Obtense finalmente o produto final, o SiO<sub>2</sub> mesoporoso, un sólido branco. Na Figura 9 recóllese un resumo do proceso de preparación do MCM-41.

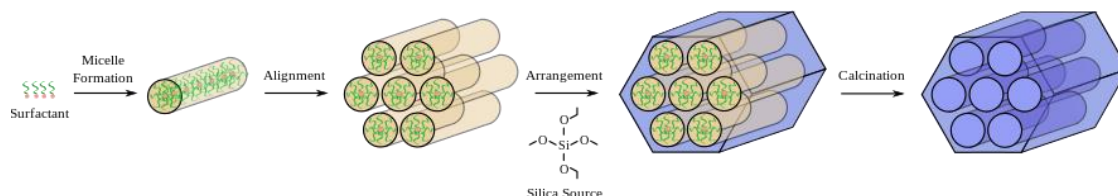


Figura 9 Imaxe esquemática da formación de SiO<sub>2</sub>

## 5.2. Síntese de nanopartículas de BaTiO<sub>3</sub>

Preparáronse nanopartículas de BaTiO<sub>3</sub> modificando o método descrito por Niederberger e colaboradores o cal segue unha síntese mediante unha vía non acuosa, cun proceso sinxelo dun só paso.<sup>17</sup> Neste método é necesario realizar a síntese cunha caixa seca, o non dispoñer dunha, fíxose unha modificación do método de síntese e neste caso o proceso consta de dúas etapas: preparación dun material precursor mediante síntese solvotermal e posterior descomposición do precursor para obter o produto desexado.

### 5.2.1. Reactivos

- Isopropóxido de titanio Fluka (99.9%)
- Acetilacetonato de bario dihidratado Sigma-Aldrich (99.9%)
- Alcohol bencílico Panreac (99.8%)

Composto	V(mL)	m(mg)	N(mmol)
Acetilacetonato de Bario dihidratado		335.56	1
Ti(OPr) <sub>4</sub>	0.295	284.2	1
Alcohol bencílico	7.5		

---

### 5.2.2. Material e montaxe

- Autoclave
- Bomba de teflón (25 mL)
- Centrifugadora Hettich Rotina 35
- Forno
- Material de filtrado a baleiro
- Micropipeta (5000  $\mu$ L)

---

### 5.2.3. Procedemento experimental

Na bomba de teflón do autoclave vértense 7.5 mL de alcohol bencílico. Seguidamente engádense 335.6 mg de acetilacetato de bario. Engádense 0.295 mL de isopropóxido de titanio. Introdúcese a mestura no autoclave, péchase e introdúcese no forno a 200°C durante 48 horas.

Tralo tratamento térmico ábrese o autoclave e lévase o contido a 2 tubos de centrifugadora, engadindo etanol ata medio tubo. Centrifúgase durante 10 minutos a 5000 rpm, elimínase o líquido e déixase secar a temperatura ambiente o sólido.

Finalmente lévase a cabo un tratamento térmico a 600°C durante 24 horas para eliminar os carbonatos presentes, quedando finalmente un sólido branco.

## 5.3. Síntese do BCP

A preparación do BCP realizouse mediante un método de vía húmida descrito por Dorozkin e colaboradores.<sup>18</sup> Este método consta de dúas etapas: unha primeira na que se obtén unha HA deficiente en Ca (CDHA) e unha segunda etapa na cal se calcina o precursor para obter BCP.

---

### 5.3.1. Síntese do precursor CDHA

Nesta primeira etapa realizouse a preparación do CDHA mediante unha vía húmida

---

### 5.3.1.1. Reaccións xerais

A formación de CDHA é a primeira etapa do método. A reacción que se produce é a seguinte:



Preténdese obter un BCP cunha proporción de HA:TCP de 1:1, polo que débense controlar as cantidades de DCPD e KOH engadidas, de forma que na segunda etapa quede a proporción desexada.

---

### 5.3.1.2. Reactivos

- Fosfato dicálcido dihidratado (DCPD) Sigma-Aldrich (98-102.5%)
- Hidróxido potásico (KOH) Vorquímica S.L. (85.2%)

Composto	m(mg)	n(mmol)
DCPD	10	55.86
KOH	3.605	64.26

---

### 5.3.1.3. Material e montaxe

- Frasco lavador de gases
- Matraz de fondo redondo (250mL) de 2 bocas
- Barra axitadora magnética
- Soporte de aluminio para matraz
- Placa calefactora IKA RTC Basic con sonda
- Burbuxeador
- Horno Mufla Lenton LTF 15/50/80
- Crisol
- Refrixerante Liebig
- Tubos de silicona
- Tubos de centrifugadora
- Centrifugadora Hettich Rotina 35
- Tapóns, roscas e pinzas

- Balanza analítica IKA RCT Safety Control
- Vidrio de reloxo
- Espátula
- Morteiro de ágata
- Prensa Specac

Montaxe (véxase Figura 10):

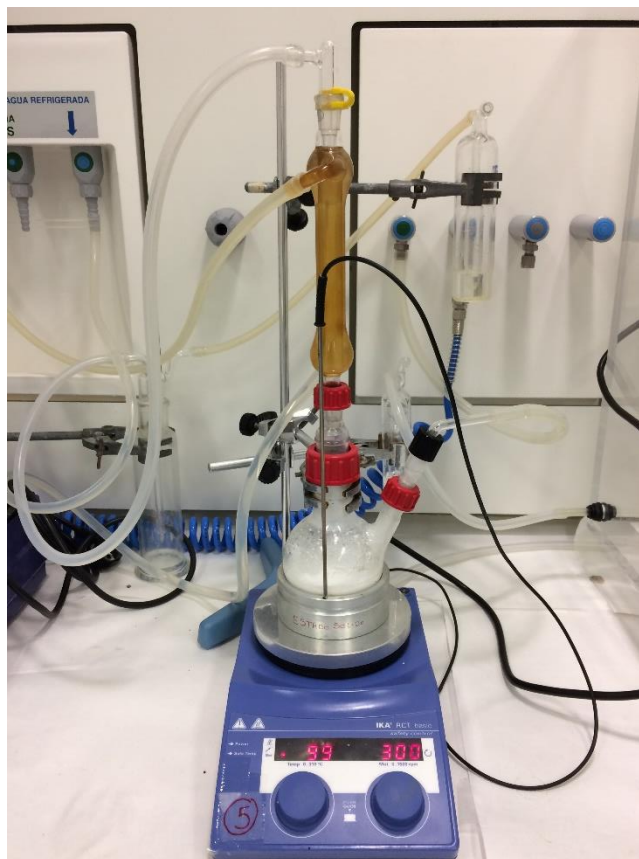


Figura 10 Montaxe da síntese de BCP

### 5.3.1.4. Procedemento experimental

Pártese de 10 g de DCPD (experimentalmente pesáronse 10.003+/-0.001 g), que se pesarán en balanza analítica. Engádense a un matraz de 250 mL de fondo redondo, con 100 mL de auga destilada e cunha barra axitadora. Realízase a montaxe da *Figura 12* e faise circular unha corrente de N<sub>2</sub> durante 15 minutos con axitación.

Seguidamente pésase a cantidade estequiométrica de KOH (segundo a reacción da etapa 1 do apartado 5.1.1), que se corresponde con 3,605 g (experimentalmente pesáronse 3.607 +/- 0.001g) para 10 g de DCPD. Engádense á disolución a cantidade de KOH.

Cérrase o sistema e conéctase a calefacción a 115°C. Déixase a refluxo 4 horas con axitación constante a 300 rpm e corrente de N<sub>2</sub>.

Tras 4 horas de refluxo retírase a calefacción e déixase arrefriar a temperatura ambiente.

Unha vez arrefriada a disolución, lévase a dous tubos de centrífuga, tápanse con parafilm e centrifúgase a 5000 rpm durante 3 minutos. Retírase o sobrenadante e lávase con auga destilada. Logo do lavado, tápanse de novo e introdúcese en baño de ultrasóns con axitación manual. Seguidamente repítese o ciclo de centrifugación, lavado e redisolución ata que o pH (medido con papel indicador) sexa neutro, o que supón 8 ciclos. O seguinte paso é filtrar a baleiro e deixar a secar o sólido 12 horas a 80°C.

Finaliza así a primeira etapa, obténdose coma produto 5.324 g de HA deficiente en calcio (CDHA).

---

### **5.3.2. Síntese de BCP a partir de CDHA**

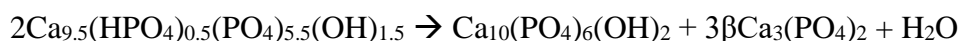
Nesta segunda etapa do método prodúcese a descomposición térmica de CDHA para dar lugar ao BCP. Neste paso o CDHA introdúcese na mufla coa seguinte secuencia de temperaturas:

7°C/min ata 600°C, 1 hora a 600°C, 7°C/min ata 1050°C, 4 horas a 1050°C e finalmente apágase e déixase arrefriar a temperatura ambiente.

---

#### **5.3.2.1. Reaccións xerais**

Nesta etapa lévase a cabo a descomposición térmica do precursor:





## 5.4. Conformado poroso dos materiais

Realizáronse tres sínteses principais, a do BCP xunto cun polímero poroso (espuma de estropallo) con función estrutural e un polímero ligante; a do BCP xunto cos mesmos polímeros e SiO<sub>2</sub> mesoporoso; e o mesmo pero con nanopartículas de BaTiO<sub>3</sub> en lugar de SiO<sub>2</sub>. O procedemento experimental é o mesmo coa diferenza de engadir SiO<sub>2</sub>, BaTiO<sub>3</sub> o non engadilos.

### 5.4.1. Conformado poroso do BCP

Para a preparación de BCP cos poros desexados para aplicacións na rexeneración de tecido óseo, utilizouse coma base estrutural un polímero poroso extraído da parte esponxosa dun estropallo (véxase Figura 11). Pártese de 0.1 g de CDHA sintetizada previamente que se dispersa en 1 mL de EtOH e engádese 0.15 g de PEG que actúa coma dispersante, facilitando a adhesión entre o material cerámico e o polimérico. Nun morteiro móese a CDHA e vaise engadindo sobre o po, gota a gota, a disolución do ligante ata formar unha pasta tipo escaiola moi viscosa. Sobre esa pasta arrástrase un cubo do polímero estrutural (de aproximadamente 1cm de lado) e faise presión sobre el ata que absorba a maior cantidade de pasta posible, véxase Figura 12.



Figura 11 Polímero estrutural empregado para o conformado do BCP.



Figura 12 Polímero estrutural impregnado coa pasta.

Finalmente aplícase o seguinte tratamento térmico: 7°C/min ata 600°C, 1 hora a 600°C, 7°C/min ata 1050°C, 4 horas a 1050°C e para rematar apágase e déixase arrefriar a temperatura ambiente.

### 5.4.2. Preparación dos materiais compostos BCP-SiO<sub>2</sub> e BCP-BaTiO<sub>3</sub> e o seu conformado poroso

Para esta síntese pártese do BCP formado coa ruta explicada no apartado anterior. Engádense 0.1 g de BCP, 0.035 g de SiO<sub>2</sub> mesoporoso ou BaTiO<sub>3</sub> e o ligante (PEG en EtOH). Utilízase a mesma estrutura polimérica. O tratamento térmico é o seguinte: 5°C/min ata 500°C, 1 hora a 500°C e finalmente déixase arrefriar a temperatura ambiente.

O método utilizado foi o que mellores resultados presentou dentro das distintas estratexias empregadas para o conformado (véxase a Figura 13 e a Figura 14). No apartado de resultados e conclusións analízanse os distintos ensaios realizados.

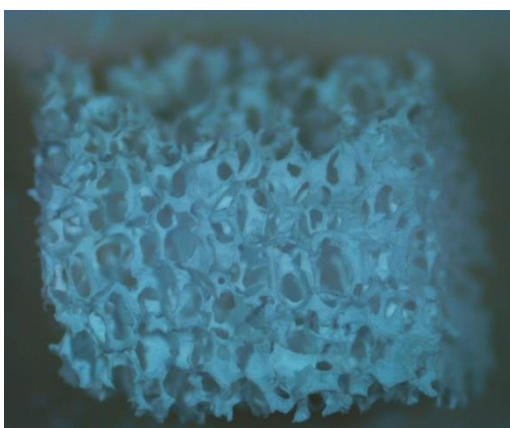


Figura 13 Imaxe do BCP+SiO<sub>2</sub>



Figura 14 Imaxe do BCP+BaTiO<sub>3</sub>

## 6. INSTRUMENTAL E MÉTODOS

### 6.1. Caracterización por difracción de Raios X

A difracción de raios X (RX) de po cristalino é unha técnica de caracterización non destrutiva usada de forma común na identificación de fases cristalinas presentes nun material e tamén na determinación estrutural de cada fase. É útil tamén para a cuantificación de compostos cristalinos, determinación de tamaño de cristais, cálculos sobre a simetría dun cristal e obtención de parámetros de rede.<sup>19</sup>

Neste traballo tamén se vai empregar a técnica de espallamento de raios X a baixos ángulos, a cal permite caracterizar materiais nanoestruturados. Esta técnica permite determinar distribución de tamaños, determinar tamaños de poros, etc. A diferenza da difracción de RX, nesta técnica non é necesario que o material sexa cristalino.

O equipo utilizado para a caracterización por RX dos compostos sintetizados é un difractómetro de RX SIEMENS D5000 (véxase Figura 15) situado no edificio de Servizo de Apoio á Investigación da Universidade de A Coruña.



Figura 15 Difractómetro SIEMENS D5000

A identificación das fases cristalinas realizouse mediante a análise dos difractogramas e a súa comparación cos da base de datos de The International Centre for Diffraction Data (ICCD-2004), empregando o programa Match! (versión 2.4.7).<sup>20, 21</sup>

## 6.2. Caracterización por Espectroscopía IR

A espectroscopía IR permite a identificación de bandas de absorción producidas pola diferente vibración dos enlaces dun composto. Para a caracterización dos compostos empregados utilízase a técnica de espectroscopía IR con transformada de Fourier (FTIR) de reflectancia total atenuada (ATR). Na Figura 16 pódese ver un esquema da técnica

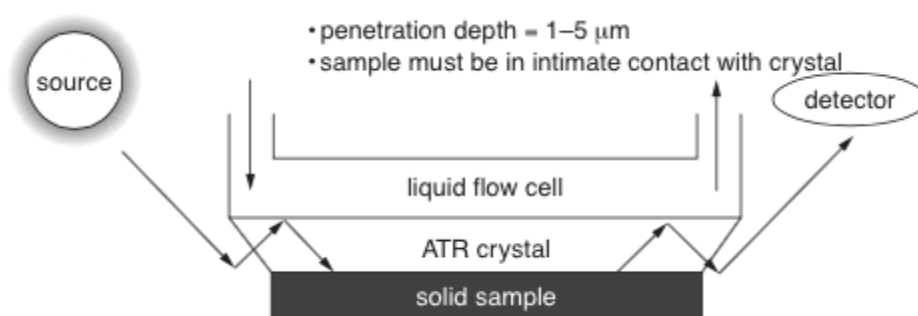


Figura 16 Esquema de FTIR-ATR

Para a caracterización por espectroscopía utilizáronse dous equipos, por unha banda o ThermoScientific Nicolet iS10 situado no Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) da Universidade de A Coruña (véxase Figura 17) e o equipo Agilent Technologies Cary 630 FTIR Spectrometer da empresa Developbiosystem S.L., situada en Cedeira (véxase Figura 18).

A análise dos espectros obtidos realizouse mediante o programa OMNIC (versión 9.3.32) e comparáronse coas bases de datos recollidas no programa.<sup>22</sup>



Figura 17 FTIR-ATR ThermoScientific Nicolet iS10
















Figura 18 FTIR-ATR Cary 630 FTIR Spectrometer

### 6.3. Caracterización por microscopía electrónica

A microscopía electrónica é unha técnica que permite a caracterización de sólidos para estudar a súa estrutura, morfoloxía e tamaño de partícula. O seu principio básico é similar ao da microscopía óptica, pero co emprego de electróns en lugar de luz visible.

Na seguinte táboa pódense ver as diferentes resolucións do ollo humano, da microscopía ótica e das microscopías TEM e SEM.<sup>23</sup>

Limit of Resolving Power	Object Size	Object	Magnification
Human Eye 	10 mm	Ant 	1X
	1 mm	Tick 	1X
Optical Microscope 	100 µm	Butterfly Scales 	1X
	10 µm	Pollen 	10X
	1 µm	Red Blood Cells 	100X
	100 nm	Bacteria 	1000X
Scanning Electron Microscope 	100 nm	Virus 	1,000X
	10 nm	Molecules (Not directly viewable) 	10,000X
Transmission Electron Microscope 	1 nm	Atoms	100,000X
	0.1 nm	(Atomic Structure of Materials Viewable in TEM) 	1,000,000X

### 6.3.1. Microscopía electrónica de varrido (SEM)

A SEM emprégase comunmente para xerar unha imaxe da topografía da superficie dun material e ten os seguintes compoñentes (véxase Figura 19):<sup>19</sup>

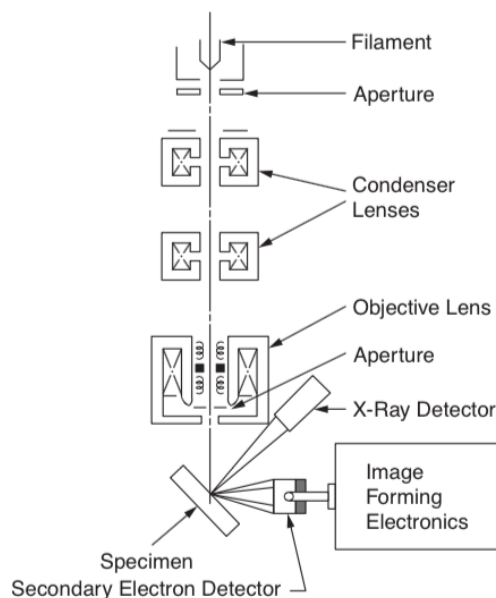


Figura 19 Esquema de compoñentes de SEM

Un filamento de tungsteno quéntase para xerar electróns, que se aceleran cunha diferenza de potencial. Os electróns enfócanse cara a superficie da mostra cun condensador e diferentes lentes. Finalmente os electróns fanse pasar pola mostra usando bobinas de escaneado. A colisión dos electróns coa mostra xera dispersión elástica e inelástica. Un dos sinais moi empregadas na caracterización son os RX xerados. Esta técnica coñécese co nome de análise de enerxía dispersa de RX (EDX ou EDAX), e emprégase para identificar a composición química do material.<sup>21</sup>

As micrografía SEM obtidas fixéronse co JEOL Nikon NeoScope JCM-6000 situado en DevelopBiosystem S.L. (véxase a Figura 20).



Figura 20 JEOL Nikon NeoScope JCM-6000

### 6.3.2. Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)

A TEM proporciona unha imaxe directa dun sólido a gran aumento a partir da transmisión de electróns a través dunha mostra.<sup>19</sup>

No microscopio TEM irradíase unha mostra delgada con electróns de densidade de corrente uniforme, xerado cun filamento de tungsteno ou de hexaboruro de lantano. Aceléranse os electróns cunha diferenza de potencial e diríxense á mostra. Ao interactuar coa mostra, parte dos electróns son transmitidos, outra parte é dispersada e outra da lugar a outro tipo de interaccións.

A caracterización das mostras realizouse co microscopio JEOL JEM 1010 de 100 kV que se atopa nos Servicio de Apoio á Investigación (SAI) da UDC (véxase a Figura 21).



Figura 21 JEOL JEM 1010

## 6.4. Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) baséase na medida da variación da masa dunha mostra cando dita mostra sométese a un programa de temperaturas nunha atmosfera controlada, pódese ver un esquema na Figura 22. A perda de auga pola cristalización ou perda de elementos volátiles mostran unha perda de peso. A oxidación ou adsorción de gas amosan unha ganancia de peso.<sup>19</sup>

A TGA foi realizada polo persoal do SAI da UDC, e empregouse un analizador STA/TG-DSC (Simultaneous Termogravimetry – Diferencial Scanning Calorimetry) Netzsch STA 449 Jupiter.<sup>24</sup>

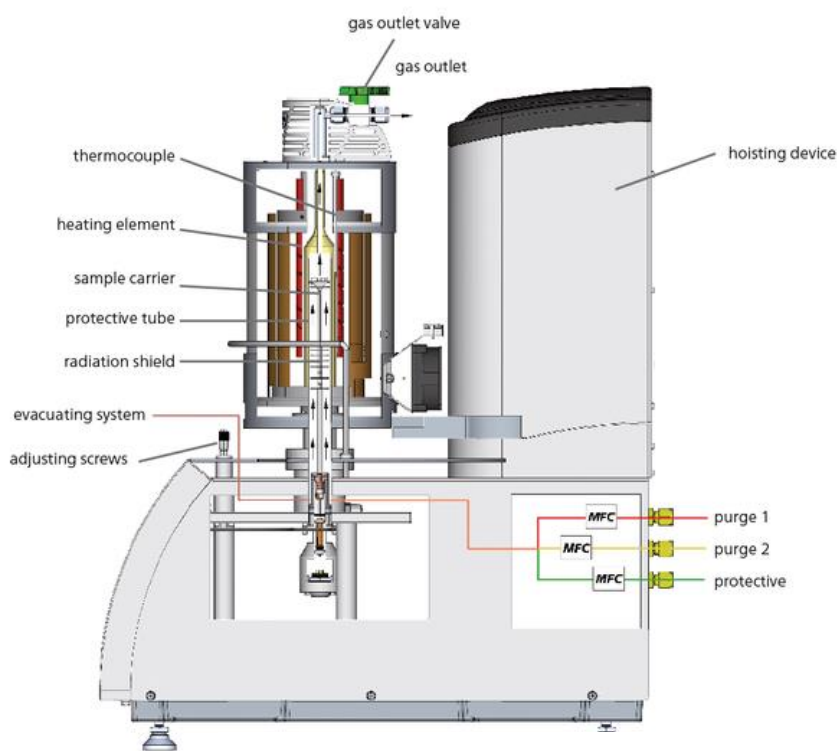


Figura 22 Esquema DSA/TG-DSC

As análises realizáronse cun quentamento constante da mostra a 10°C/min dende temperatura ambiente ata 1000°C en atmosfera de aire.



## 7. RESULTADOS E DISCUSIÓN

### 7.1. Caracterización de BCP, SiO<sub>2</sub> mesoporoso e BaTiO<sub>3</sub>

#### 7.1.1. Caracterización de BCP

##### 7.1.1.1. Caracterización de BCP por TGA

Tal e como se comenta no apartado 5.3., a síntese de BCP lévase a cabo en dúas etapas: formación do precursor CDHA e tratamento térmico deste. Realizouse a caracterización de CDHA mediante análise termogravimétrica (TGA).

Na Figura 23 pódese observar a perda de masa da CDHA cando se quenta dende temperatura ambiente ata 1000°C. Á vista do diagrama pódese ver como se vai perdendo masa de forma gradual dende o 100% ata aproximadamente o 91%. Para explicar este fenómeno analizarase a fórmula da CDHA:  $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ . Analizando a perda de masa, pódese supoñer que esta prodúcese pola eliminación de auga na superficie das partículas e, tamén, da perda de auga producida pola descomposición de  $\text{HPO}_4^{2-}$  e  $\text{OH}^-$  para formar  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{H}_2\text{O}$ .<sup>5, 25</sup>

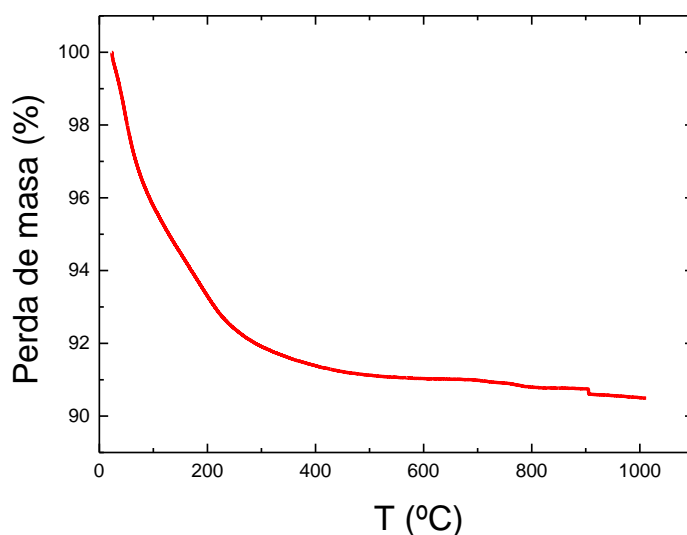


Figura 23 Termograma do composto CDHA

### 7.1.1.2. Caracterización de BCP por DRX

Caracterizouse mediante difracción de RX de po o BCP obtido. Na Figura 24 móstrase o difractograma do BCP.

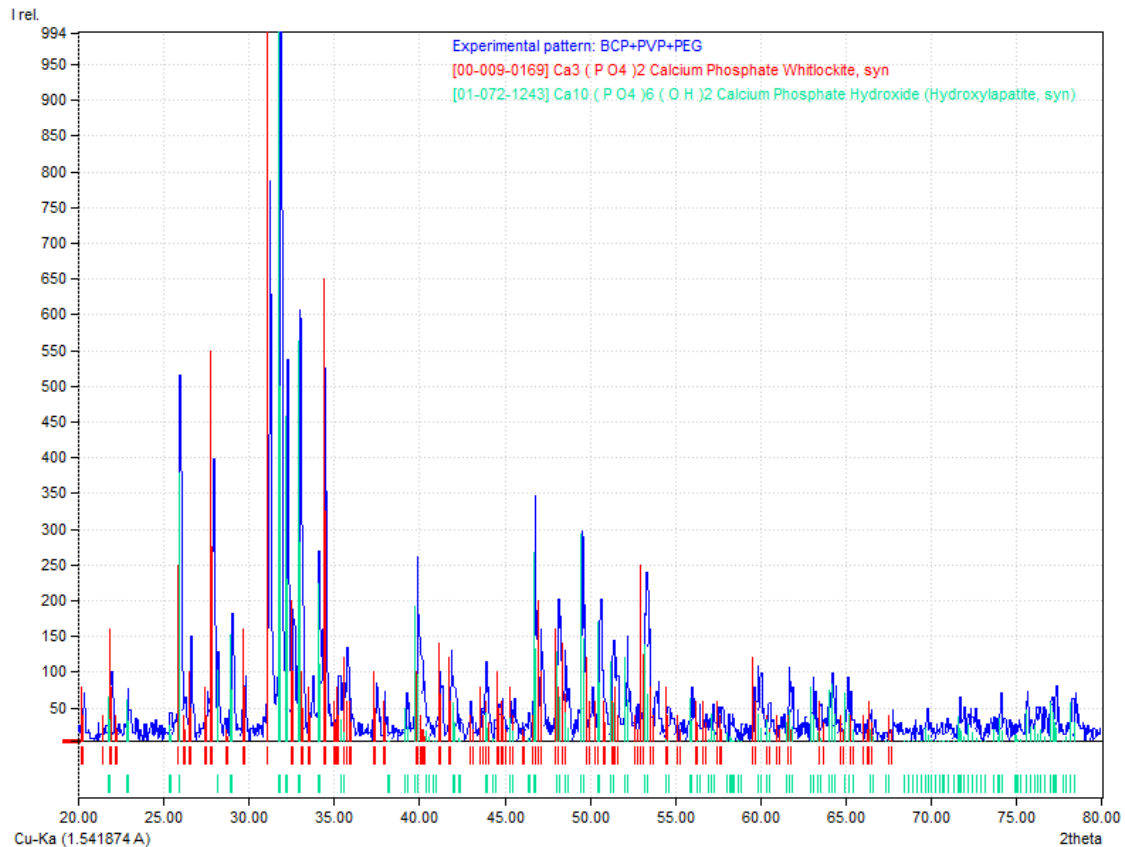


Figura 24 Difractograma do BCP obtido comparado cos difractogramas de HA e TCP

En cor azul está representado o difractograma obtido para unha mostra do BCP sintetizado, mentres que en vermello e verde están os difractogramas bibliográficos dados polo programa Match! de TCP e HA, respectivamente. Pódese ver como os picos dos difractogramas de HA (verde) e de TCP (vermello) coinciden.

Á vista dos resultados obtidos pódese confirmar que se formaron as dúas fases de fosfato cálcico, HA e  $\beta$ -TCP.

### 7.1.1.3. Caracterización de BCP por espectroscopía IR

Caracterizouse mediante FTIR-ATR o BCP sintetizado. Na Figura 25 podemos observar o espectro obtido.

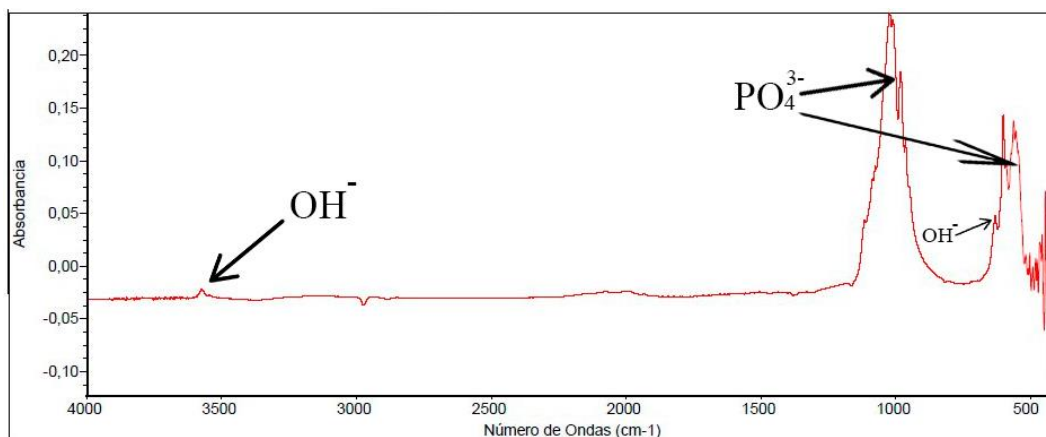


Figura 25 Espectro IR do BCP obtido

Observando o espectro pódense apreciar dúas bandas moi intensas a  $1000\text{cm}^{-1}$  e a  $500\text{cm}^{-1}$ , así como unha banda moito menos intensa a  $3600\text{cm}^{-1}$ . Observando a composición química do BCP, unicamente poden ser activos en IR os fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e o hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) da HA.

O anión fosfato presenta catro tipos de vibracións: deformacións de flexión (O-P-O) asimétrica e simétrica, e deformacións de tensión (P-O) asimétrica e simétrica, das cales só son activas en IR as deformacións de flexión e tensión asimétricas.

A banda a  $1000\text{cm}^{-1}$  correspóndese coa deformación de tensión asimétrica do fosfato e a de  $500\text{cm}^{-1}$  corresponde coa deformación de flexión asimétrica do fosfato. A banda menos intensa a  $3600\text{cm}^{-1}$  correspóndese coa vibración de tensión do hidroxilo. Pódese tamén observar a  $630\text{cm}^{-1}$  unha banda solapada que tamén pertence ao hidroxilo. <sup>31</sup>

## 7.1.2. Caracterización de SiO<sub>2</sub> mesoporoso

Caracterizouse mediante distintas técnicas o SiO<sub>2</sub> sintetizado para comprobar a súa composición, distribución de poros e morfoloxía.

### 7.1.2.1. Caracterización de SiO<sub>2</sub> mesoporoso por espectroscopía IR

Caracterizouse o SiO<sub>2</sub> mesoporoso obtido mediante espectroscopía IR. Na Figura 26 pódese observar o espectro IR do SiO<sub>2</sub> obtido comparado cun espectro de SiO<sub>2</sub> bibliográfico.

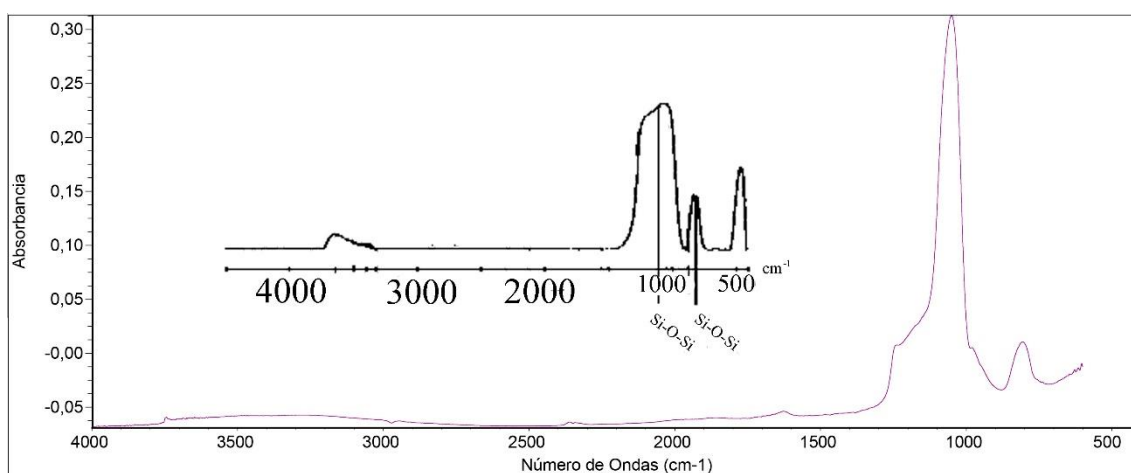


Figura 26 Espectro IR do SiO<sub>2</sub> mesoporoso obtido

Á vista da comparativa pódese concluír que obtívose SiO<sub>2</sub>, pois pódense identificar as bandas de tensión Si-O e flexión Si-O-Si.<sup>30</sup>

### 7.1.2.2. Caracterización de SiO<sub>2</sub> mesoporoso por espallamento de Raios X de baixo ángulo

Este composto é amorfo polo que non se pode caracterizar mediante DRX, pero ao presentar unha estrutura mesoporosa ordeada é posible caracterizar esta estrutura mediante espallamento de raios X de baixo ángulo. Na Figura 27 pódese observar o gráfico de espallamento de RX

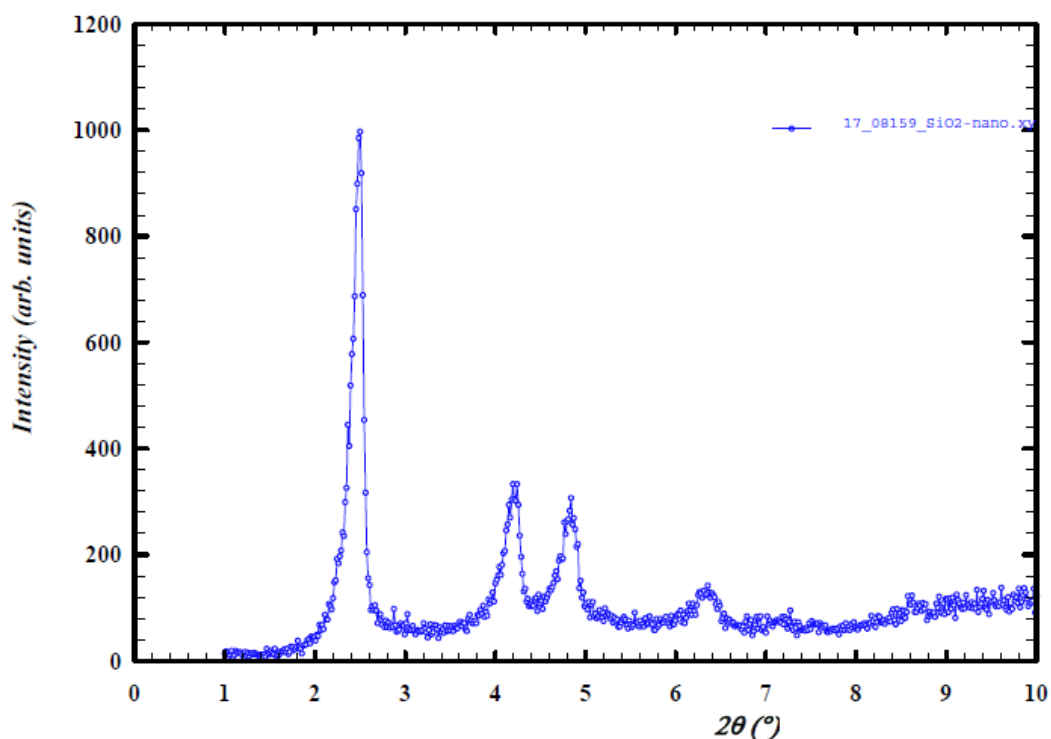


Figura 27 Gráfico de espallamento de RX do SiO<sub>2</sub> obtido

Como se pode observar no gráfico, aparecen uns máximos na gráfica que son debidos ao ordenamento regular a longo alcance dos poros no interior deste material. O resultado obtido confirma que se formou a estrutura porosa desexada.

### 7.1.2.3. Caracterización morfolóxica de SiO<sub>2</sub> mesoporoso mediante TEM

Obtivéronse varias imaxes mediante TEM de pequenas partículas do SiO<sub>2</sub> obtido (véxase a Figura 28).

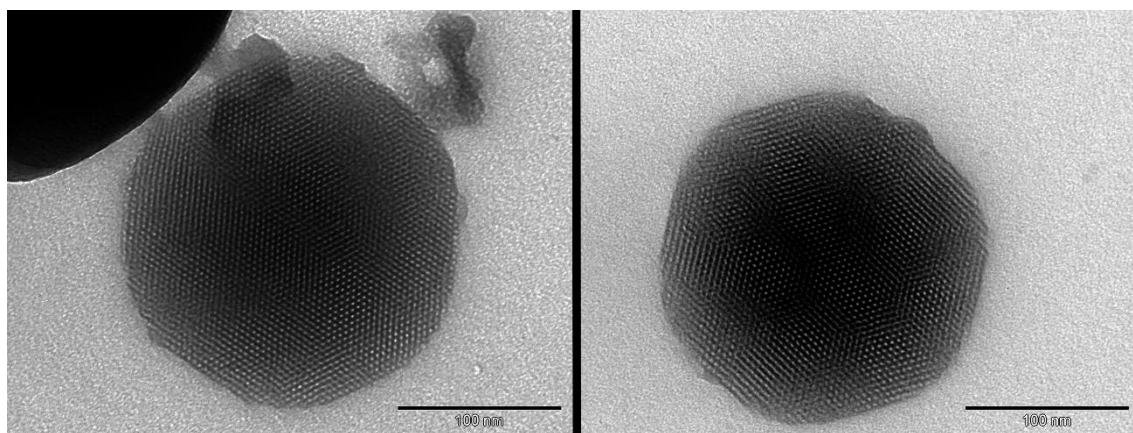


Figura 28 Imaxes de TEM do SiO<sub>2</sub> mesoporoso formado

Observando as imaxes pódense apreciar perfectamente os poros formados en 2 partículas de SiO<sub>2</sub>. As partículas, de forma esférica, posúen un tamaño aproximado de 150 nm e no seu interior teñen uns poros perfectamente ordenados de aproximadamente 3 nm de diámetro.

Pódese concluír, polo tanto, que formouse SiO<sub>2</sub> mesoporoso satisfactoriamente, co tamaño e distribución de poro desexado.

### 7.1.3. Caracterización de BaTiO<sub>3</sub>

Caracterizouse mediante distintas técnicas o BaTiO<sub>3</sub> sintetizado para comprobar a súa composición, estrutura e morfoloxía.

#### 7.1.3.1. Caracterización de BaTiO<sub>3</sub> por DRX

Realizouse a caracterización do BaTiO<sub>3</sub> por difracción de RX de po. Na Figura 29 pódese observar o difractograma obtido.

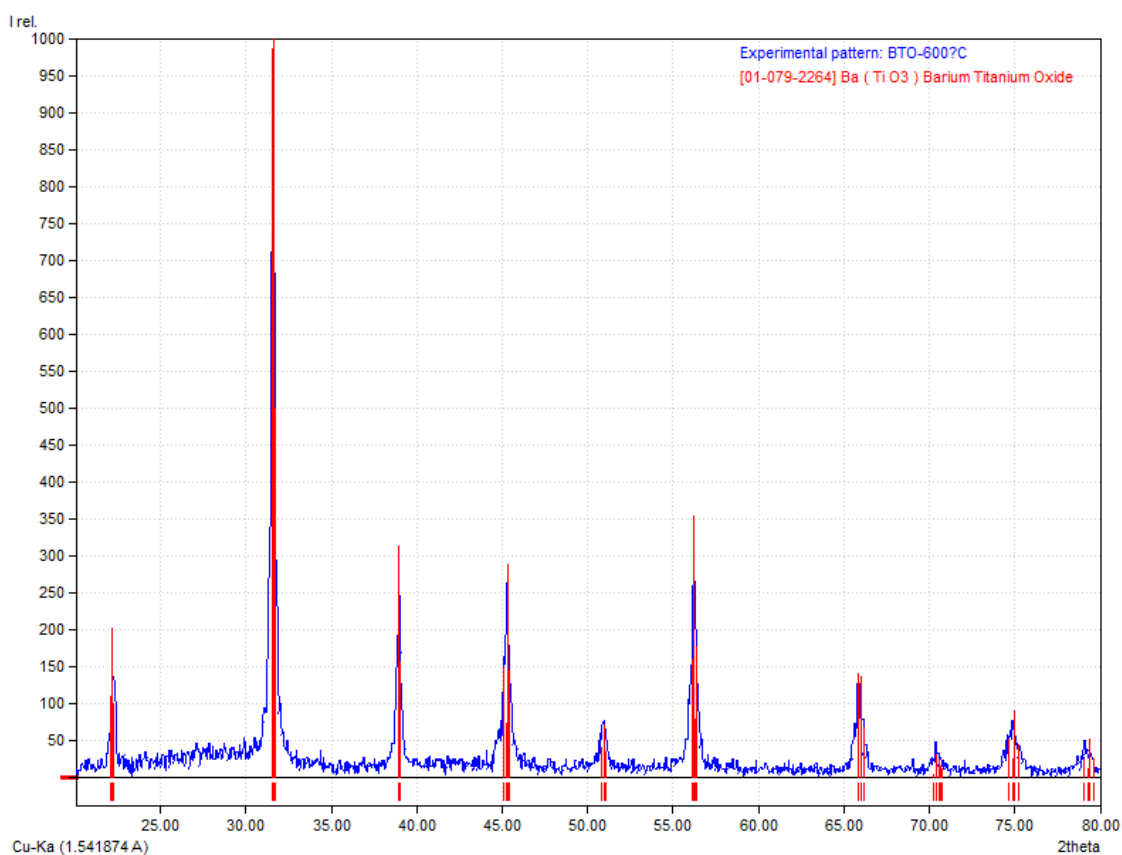


Figura 29 Difractograma do BaTiO<sub>3</sub> comparado cun difractograma de BaTiO<sub>3</sub> puro

Á vista da Figura 29, onde podemos ver o difractograma do BaTiO<sub>3</sub> obtido comparado co difractograma de referencia aportado polo programa Match!, pódese ver que os picos de ámbolos difractogramas coinciden, confirmado que se obtivo a fase desexada e que esta é pura.

### 7.1.3.2. Caracterización morfolóxica de BaTiO<sub>3</sub> mediante TEM

Obtivéronse varias imaxes mediante TEM de pequenas partículas do BaTiO<sub>3</sub> obtido (véxase a Figura 30)

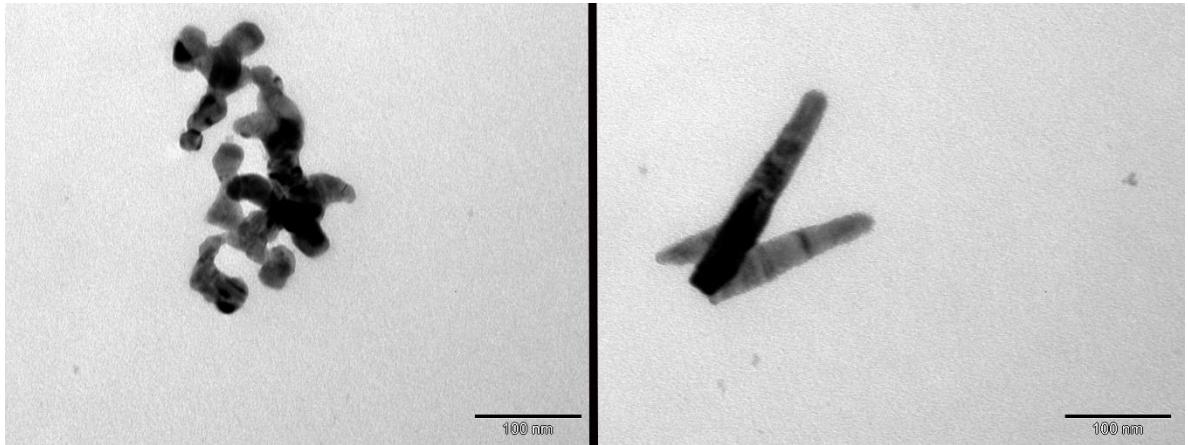


Figura 30 Imaxes de TEM do BaTiO<sub>3</sub> formado

Na Figura 30 pódense observar dúas imaxes de partículas do BaTiO<sub>3</sub> obtido. Á vista das imaxes pódese apreciar que se formaron nanopartículas do composto cun tamaño de partícula de aproximadamente 20 nm.

Pódese concluír, polo tanto, que se formaron nanopartículas de BaTiO<sub>3</sub> do tamaño desexado, idóneas para integrarse na estrutura porosa do BCP, onde se espera que favorezan a adherencia do tecido óseo.



## 7.2. Caracterización dos materiais con morfoloxía porosa

Caracterizáronse os conformados porosos de BCP, BCP-SiO<sub>2</sub> e BCP-BaTiO<sub>3</sub>.

### 7.2.1. Caracterización do conformado de BCP poroso

#### 7.2.1.1. Caracterización do polímero poroso por espectroscopía IR

Caracterizouse mediante espectroscopía IR o polímero que serve coma base estrutural para o conformado poroso dos materiais (véxase a Figura 31). O polímero foi extraído da parte esponxosa dun estropallo comercial.

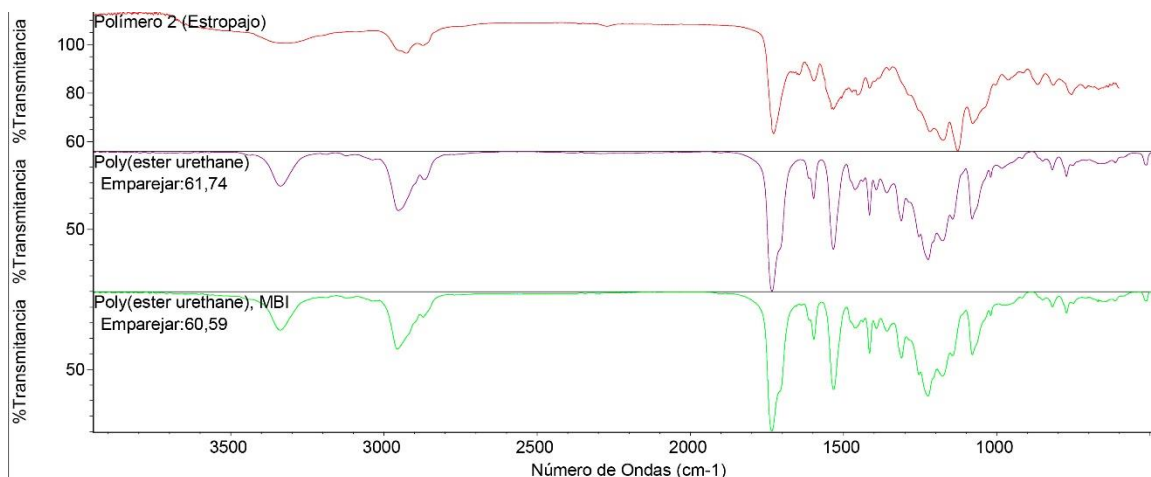


Figura 31 Espectro IR do Polímero estrutural comparado con espectros de Poliuretano

Na Figura 31 pódese ver o espectro IR do polímero estrutural comparado con dous espectros de poliuretanos da biblioteca de espectros do programa OMNIC. Á vista dos espectros pódese concluír que o polímero empregado neste traballo é da familia dos poliuretanos.

### 7.2.1.2. Caracterización de CDHA + polímero estrutural mediante TGA

Realizouse tamén a análise termogravimétrica da CDHA xunto co polímero estrutural, identificado coma poliuretano. No proceso sintético cabe esperar que a CDHA quede adherida ao polímero estrutural ao mesturala cun ligante (PEG+EtOH) e que co tratamento térmico (1050°C) quede unicamente o BCP coa forma do polímero e que este quede eliminado.

Á vista da figura 32, onde se observa a perda de masa do material fronte á temperatura, pódense observar dúas perdas importantes de masa: a primeira perda, por debaixo dos 90°C, pode atribuírse ao disolvente (etanol e auga); e a segunda perda de masa, situada entre 150°C e 400°C pódese atribuír á eliminación do polímero estrutural (poliuretano) e do PEG, que descompoñen entre 290°C e 350°C.<sup>26, 27, 28, 29</sup>

Tamén se poder observar na figura como a temperaturas superiores a 500°C apenas hai unha perda de masa.

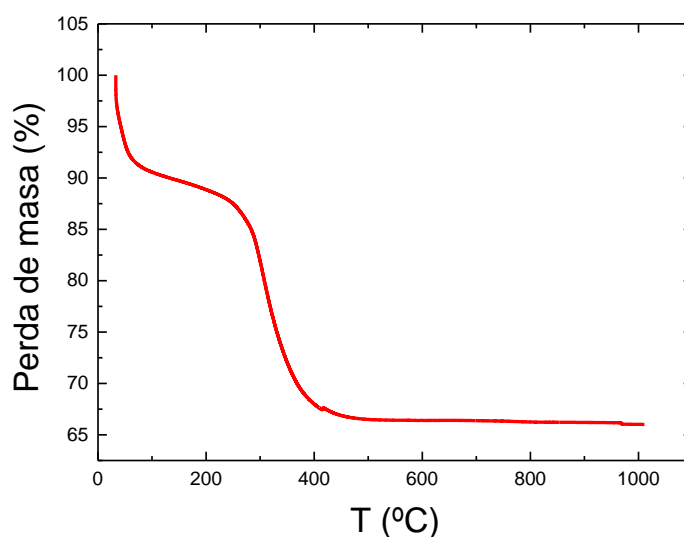


Figura 32 Diagrama de TGA da CDHA + Polímero Estrutural

### 7.2.1.3. Caracterización morfolóxica do conformado de BCP mediante microscopía óptica e SEM

Débese comprobar que o material sintetizado posúa a porosidade desexada, que debe ser da orde de 500 $\mu$ m. A maior porosidade, maior superficie e, polo tanto, favorécese a interacción do biomaterial co tecido biolóxico.

Para observar a porosidade obtivéronse diferentes fotografías para poder observar os poros. Para ver os poros da orde de medio milímetro fixéronse fotos con microscopía óptica (véxase a Figura 33) e SEM (véxase a Figura 34).

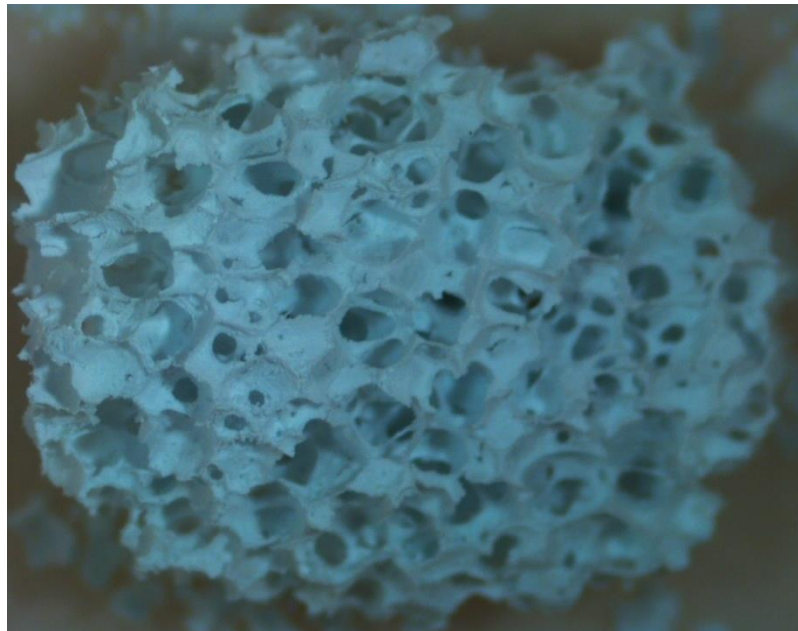


Figura 33 Imaxe con Microscopio Óptico do BCP sintetizado

Na Figura 33, fotografía realizada cun microscopio óptico, pódense observar os poros de ata medio milímetro formados.

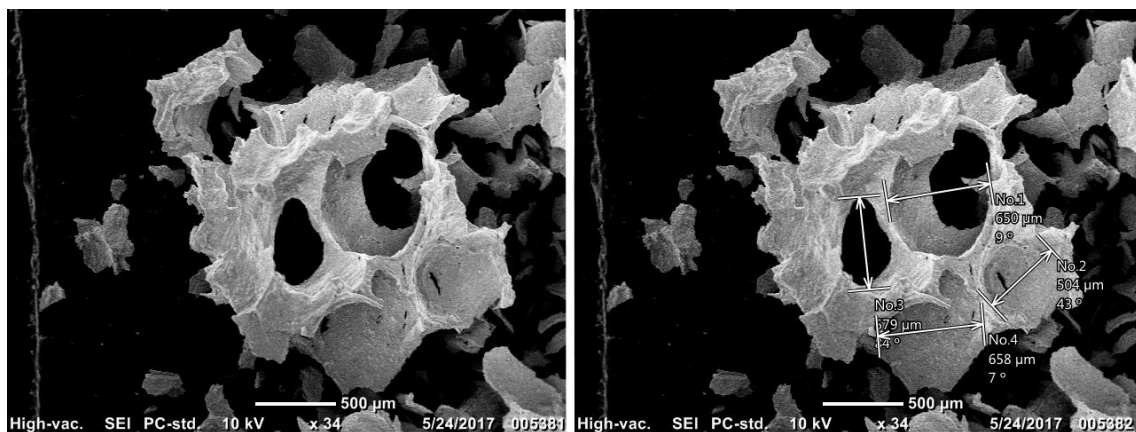


Figura 34 Imaxe de SEM do BCP formado a 34 aumentos(dereita con tamaño de poro)

Na Figura 34, fotografía obtida mediante SEM a 34 aumentos, pódese ver a lonxitude dos poros formados.

Á vista das imaxes pódese concluír que se formaron os poros da orde de medio milímetro. Pódese concluír, polo tanto, que o tamaño de poro do BCP sintetizado correspóndese co diámetro desexado, da orde de 0.5mm. Pódese determinar, entón, que a morfoloxía do BCP formado é apto para a rexeneración ósea, posto que co tamaño de poro acadado, as interaccións biomaterial-tecido son altas, xa que a maior porosidade, maior superficie de contacto e maior número de interaccións.

## 7.2.2. Caracterización do conformado BCP-SiO<sub>2</sub>

### 7.2.2.1. Caracterización do conformado BCP-SiO<sub>2</sub> por DRX

Caracterizouse mediante difracción de RX de po o BCP con SiO<sub>2</sub> mesoporoso obtido (Véxase a Figura 35).

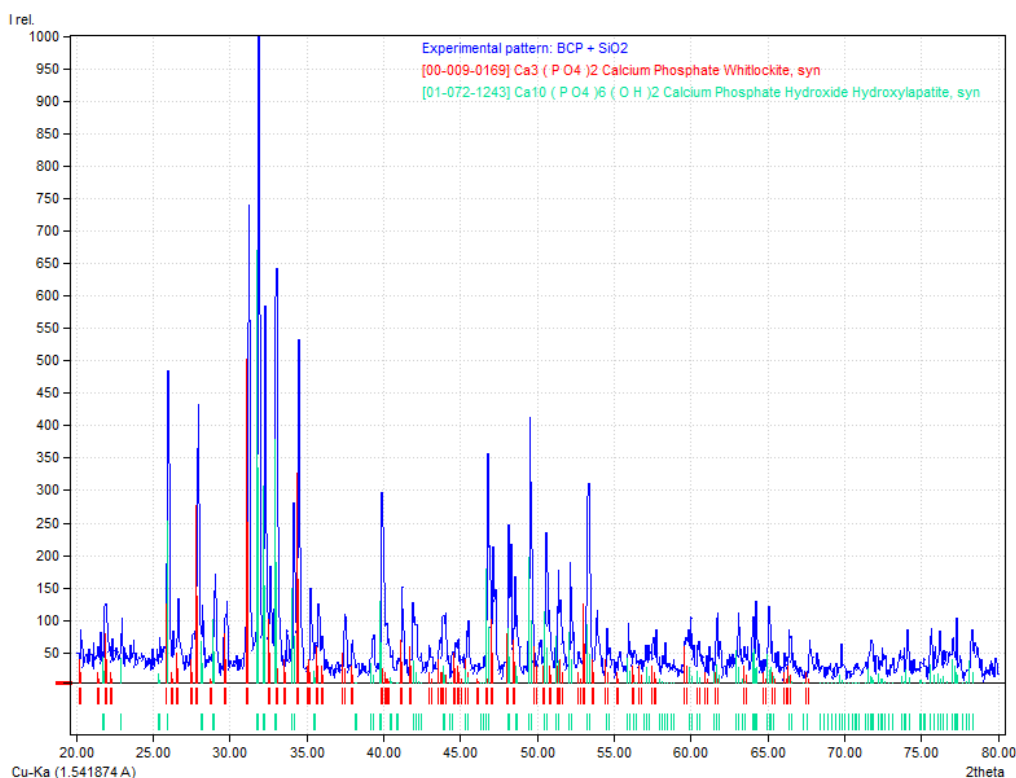


Figura 35 Difractograma de BCP+SiO<sub>2</sub> mesoporoso comparado con diffractogramas de fosfato cálcico e SiO<sub>2</sub>

Na figura 35 pódese ver o difractograma obtido comparado con difractogramas de  $\beta$ -TCP (vermello) e HA (verde). Pódese ver como os máximos do difractograma obtido coinciden cos compostos desexados. Non se observan máximos debidos o  $\text{SiO}_2$ , debido a que neste caso o material é amorfo, nin tampouco se observan outras fases que indiquen que o  $\text{SiO}_2$  reaccionase co  $\beta$ -TCP ou HA durante o tratamento térmico.

Pódese concluír, polo tanto, que se formou o composto desexado, coas partículas de  $\text{SiO}_2$  dispersas nunha matriz de BCP. O tamaño de poro acadado permite que a liberación de ións  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  por parte do TCP sexa modulada, o cal espérase que mellore a capacidade de osteoindución do BCP. Ademais, espérase que as propiedades piezoeléctricas do  $\text{SiO}_2$  favorezan a integración do biomaterial no tecido óseo, xa que o coláxeno tamén presenta esta propiedade.

#### **7.2.2.2. Caracterización morfolóxica do conformado BCP- $\text{SiO}_2$ mediante microscopía óptica**

Realizáronse fotos mediante microscopía óptica do BCP con  $\text{SiO}_2$  mesoporoso sintetizado.

Na Figura 36 pódese observar unha imaxe do material obtido. Pódense apreciar os poros de ata medio milímetro formados.

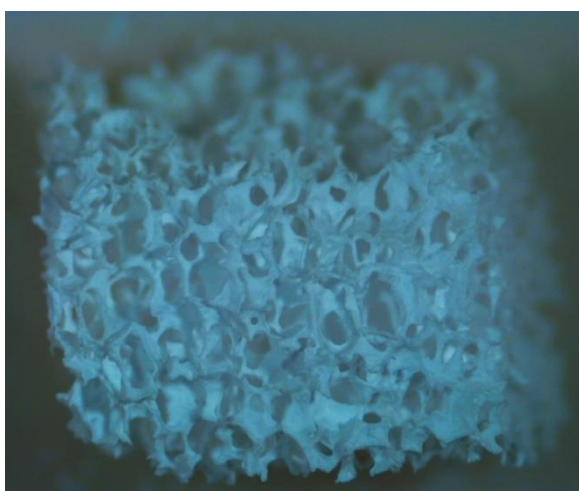


Figura 36 Imaxe do BCP +  $\text{SiO}_2$  mesoporoso

Á vista da imaxe pódese concluír que se formaron os poros do tamaño desexado (da orde de medio milímetro de diámetro).

## 7.2.3. Caracterización de BCP + BaTiO<sub>3</sub>

### 7.2.3.1. Caracterización de BCP + BaTiO<sub>3</sub> por DRX

Caracterizouse mediante difracción de RX de po o BCP co BaTiO<sub>3</sub> obtido (véxase a Figura 37).

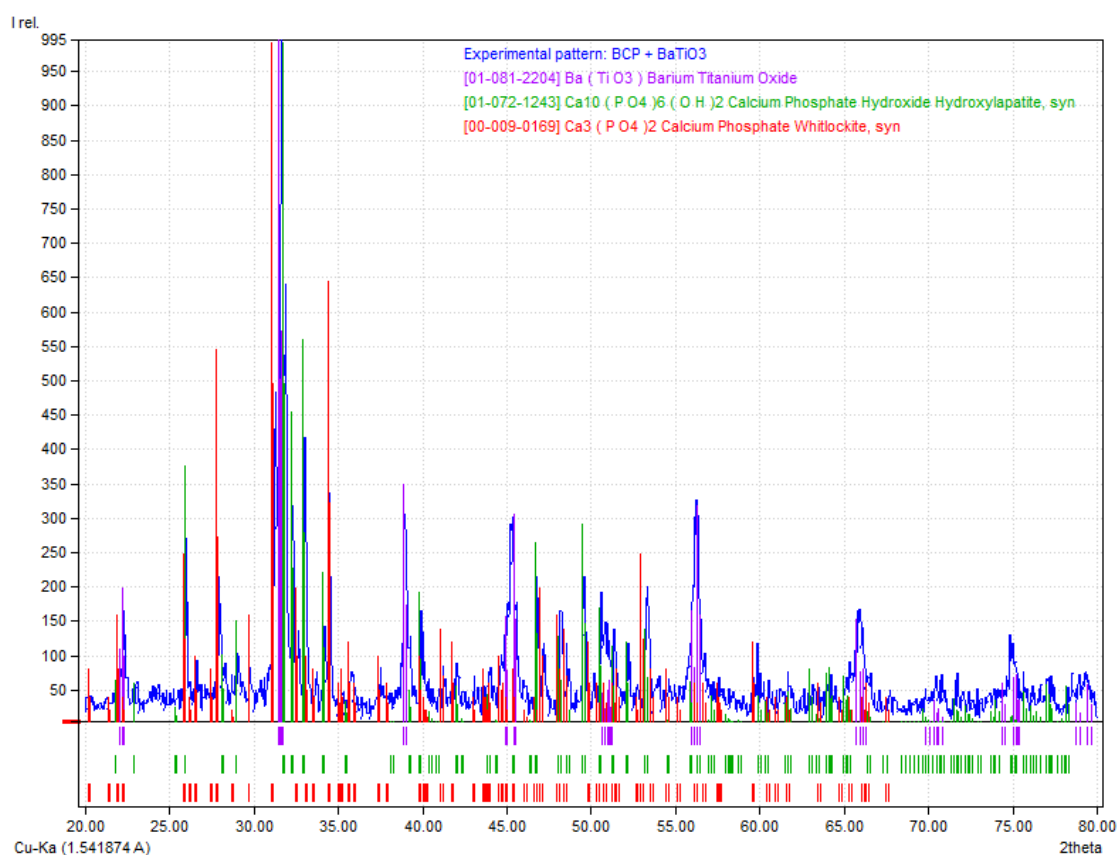


Figura 37 Difractograma de BCP+BaTiO<sub>3</sub> mesoporoso comparado con difractogramas de fosfato cálcico e BaTiO<sub>3</sub>

Na Figura 37 pódese observar o difractograma do composto de BCP e BaTiO<sub>3</sub> obtido comparado con difractogramas de  $\beta$ -TCP (vermello), HA (verde) e BaTiO<sub>3</sub> (morado) proporcionados pola base de datos do programa Match!. Á vista da comparación pódese ver como coinciden os máximos do difractograma experimental cos difractogramas da base de datos. Estes resultados confirman que se obtiveron as fases desexadas despois do tratamento térmico.

Pódese concluír, polo tanto, que se formou o composto de BCP con nanopartículas de BaTiO<sub>3</sub> incorporadas na estrutura.

### 7.2.3.2. Caracterización morfolóxica do conformado BCP- BaTiO<sub>3</sub> mediante microscopía óptica

Realizáronse fotos mediante microscopía óptica do BCP con BaTiO<sub>3</sub> sintetizado.

Na Figura 38 pódese observar unha imaxe do material obtido. Pódense apreciar os poros de ata medio milímetro formados.



Figura 38 Imaxe do BCP+BaTiO<sub>3</sub>

Pódese concluír, á vista da imaxe, que se formaron os poros co tamaño desexado.

### 7.3. Outros ensaios

Para realizar o conformado poroso dos materiais realízanse numerosos ensaios con distintos métodos de conformado, como a utilización de distintos polímeros, diferentes cantidades destes, diferentes reactivos de partida, etc. A continuación móstrase un resumo dos intentos realizados e os motivos polos que foron rexeitados.

- Vía seca de conformado empregando un polímero granulado. Mestura de CDHA, PVP e PEG, moenda dos materiais, posterior formación dunha pastilla nun troquel e finalmente calcinación para eliminar o polímero.<sup>18</sup> Para tratar de optimizar o proceso fixéronse diferentes variacións na porcentaxe de polímero empregado, na presión aplicada durante o proceso de empastillado e tempo de aplicación da presión, pero en tódolos intentos realizados os poros do produto final son demasiado pequenos non tendo as características buscadas. Polo tanto, descartouse a vía seca cun polímero granulado e inténtase realizar o conformado mediante unha vía húmida e cun polímero de natureza esponxosa.
- Vía húmida de conformado empregando un polímero esponxoso (polietileno de baixa densidade). Próbbase a facer o conformado utilizando un polímero esponxoso empregado habitualmente na embalaxe de reactivos químicos. Os materiais conformados co emprego deste polímero resultaron ser moi febles, xa que o poro do polímero era demasiado grande e non se mantiña a conformación porosa unha vez eliminado o polímero mediante o tratamento térmico. Decidiuse continuar empregando unha vía húmida pero cambiando a natureza do polímero esponxoso, neste traballo os mellores resultados obtivéronse empregando espuma de poliuretano dun estropallo comercial.
- Vía húmida de conformado empregando poliuretano esponxoso. Inicialmente, realizouse o conformado empregando como materiais partida CDHA moída con SiO<sub>2</sub> e BaTiO<sub>3</sub> (independentemente) e utilizando un polímero de estropallo coma base estrutural xunto con PEG en EtOH. Este método non é válido porque no tratamento térmico a 1050°C ten lugar a reacción do reactivos de partido e non se obtén os produto desexados.



Próbase entón a realizar a síntese utilizando o polímero de estropallo (poliuretano) coma base estrutural e o PEG en EtOH, utilizando un tratamento térmico a 500°C para que non teña lugar a reacción dos reactivos de partida e se obteñan os produtos desexados. Este método é o empregado definitivamente.

## 8. CONCLUSIÓNS/CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

### 8.1. Conclusións

En relación aos resultados obtidos, resúmense a continuación as conclusións deste Traballo de Fin de Grao:

- Conseguiuse preparar BCP a partir da síntese do precursor CDHA por unha vía húmida, resultando ser un método sinxelo de preparación. Caracterizouse o material mediante difracción de RX de po, espectroscopía IR, TGA e microscopía óptica e SEM, confirmando que se obtivo o BCP coa composición química desexada (as dúas fases de HA e  $\beta$ -TCP).
- Conseguiuse preparar SiO<sub>2</sub> mesoporoso polo método sol-xel, resultando ser unha síntese sinxela e fácil de levar a cabo. Caracterizouse mediante difracción de RX de po, espectroscopía IR e microscopía TEM, confirmando que se obtivo o material coa composición desexada e que se formaron as nanopartículas dun tamaño aproximado de 150 nm; e tamén se confirmou a natureza mesoporosa do material cunha distribución perfecta de poros de diámetros de aproximadamente 3 nm. Polo tanto, o SiO<sub>2</sub> sintetizado ten as características morfolóxicas axeitadas para poder combinarse co BCP para mellorar a capacidade de osteoindución deste.
- Conseguíronse preparar nanopartículas de BaTiO<sub>3</sub>, resultando ser unha síntese sinxela e fácil de levar a cabo. Caracterizouse mediante difracción de RX de po e microscopía TEM. Confírmouse, mediante a caracterización, que se obtivo o material coa composición desexada e que se formaron as nanopartículas co tamaño desexado, da orde de 20 nm.
- Conseguíronse preparar os conformados de BCP, BCP-SiO<sub>2</sub> e BCP-BaTiO<sub>3</sub> con morfoloxía porosa de aproximadamente 0.5 mm de poro, coas características morfolóxicas axeitadas para ser empregados na rexeneración de tecido óseo. Para preparar esta morfoloxía porosa empregouse espuma de poliuretano dun estropallo comercial como "andamiaxe" e PEG como dispersante en etanol como disolvente.

## 8.2. Conclusiones

En relación a los resultados obtenidos, se resumen a continuación las conclusiones de este Trabajo de Fin de Grado:

- Se consiguió preparar BCP a partir de la síntesis del precursor CDHA por una vía húmeda, resultando ser un método sencillo de preparación. Se caracterizó el material mediante difracción de RX de polvo, espectroscopía IR, TGA y microscopía óptica y SEM, confirmando que se obtuvo el BCP con la composición química deseada (las dos fases de HA y  $\beta$ -TCP).
- Se consiguió preparar SiO<sub>2</sub> mesoporoso por el método sol-gel, resultando ser una síntesis sencilla y fácil de llevar a cabo. Se caracterizó mediante difracción de RX de polvo, espectroscopía IR y microscopía TEM, confirmando que se obtuvo el material con la composición deseada y que se formaron las nanopartículas, de un tamaño aproximado de 150 nm; y también se confirmó la naturaleza mesoporosa del material con una distribución perfecta de poros de diámetros de aproximadamente 3 nm. Por lo tanto, el SiO<sub>2</sub> sintetizado tiene las características morfológicas adecuadas para poder combinarse con el BCP para mejorar su capacidad de osteinducción.
- Se consiguieron preparar nanopartículas de BaTiO<sub>3</sub>, resultando ser una síntesis sencilla y fácil de llevar a cabo. Se caracterizó mediante difracción de RX de polvo y microscopía TEM. Se confirmó, mediante la caracterización, que se obtuvo el material con la composición deseada y que se formaron las nanopartículas con el tamaño esperado, del orden de 20 nm.
- Se consiguieron preparar los conformados de BCP, BCP-SiO<sub>2</sub> y BCP-BaTiO<sub>3</sub> con morfología porosa de aproximadamente 0.5 mm de poro, con las características adecuadas para ser empleados en la regeneración de tejido óseo. Para preparar esta morfología porosa se empleó espuma de poliuretano de un estropajo comercial como andamiaje y PEG como dispersante en etanol como disolvente.

### 8.3. Conclusions

In relation to the results obtained, the conclusions of this Final Grade Project are summarized below:

- BCP was successfully synthesized from the preparation of the precursor CDHA by a wet-method, resulting to be a simple method of synthesis. The material was characterized by X-Ray diffraction, IR spectroscopy, TGA, optical microscopy and SEM, confirming that the BCP was obtained with the suitable chemistry composition (two phases of HA and  $\beta$ -TCP).
- $\text{SiO}_2$  was successfully synthesized by the sol-gel method, resulting to be a simple method of synthesis. The material was characterized by X-Ray diffraction, IR spectroscopy and TEM, confirming that the material was obtained with the adequate chemistry composition and the formation of nanoparticles, with a size of 150 nm approximately; additionally, it was confirmed the mesoporous nature of the material, with a perfect distribution of the pores, with diameters of 3 nm approximately. Therefore, the synthesized  $\text{SiO}_2$  has the adequate morphologic characteristics to be combined with BCP for improving its osteoinduction capacity.
- $\text{BaTiO}_3$  nanoparticles were successfully synthesized, resulting to be a simple method of synthesis. The material was characterized by X-Ray diffraction and TEM, confirming that the material was obtained with the wished chemistry composition and the formation of nanoparticles, with a size of 20 nm approximately.
- BCP, BCP- $\text{SiO}_2$  and BCP- $\text{BaTiO}_3$  composed materials were successfully prepared, with a porous morphology with diameters of 0.5 mm approximately, with the adequate characteristics to be used in osseous tissue regeneration. For the preparation of the porous morphology it was employed polyurethane foam from a commercial scourer as scaffold and PEG as dispersant in ethanol as solvent.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Vallet Regí, M. (2013). *Biomateriales*, Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Introducción.
2. Buddy D. Ratner, A.S. (2012). *Biomaterials Science, an Introduction to Materials in Medicine*. Hardcover.
3. Duffo, G. (2011). *Materiales y materias primas. Capítulo 8, Biomateriales*. Ministerio de Educación, Instituto Nacional de Educación Tecnológica, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
4. Kokubo, T. (2015). *Bioceramics and their clinical applications*; CRC Press; Vol. 1.
5. Dorozhkin, S. V. (2012). *Calcium Orthophosphates*; Pan Stanford.
6. Imaizumi, H., Sakurai, M., Kashimoto, O., Kikawa, T., Suzuki, O. (2006). *Calcified Tissue International*. 78, 45.
7. Elliott, J. C. (1994). *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*. Elsevier.
8. García-Garduño, M.V., Reyes-Gasga, J. (2006). *La Hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica*. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 9, núm. 2, 90-95. Universidad Nacional Autónoma de México.
9. Miranda, P., Saiz, E., Gryn, K., Tomsia, A. P. (2006). *Acta Biomaterialia*. 2, 457.
10. Dorozhkina, E. I., Dorozhkin, S. V. (2002). *Chemistry of Materials*. 14, 4267.
11. Fiebig M . (2006). *Revival of the magnetoelectric effec. Journal of physics d-applied of physics*, 38, R123-R152.
12. A.M. Ferreira, K. Noris-Suárez, A. Bello, A.H. Marquez, J.L. Feijoo, J. Lira-Olivares (2007). *Influencia de la piezoelectricidad del colágeno tipo I en la adhesión celular*, 1. Universidad Simón Bolívar/Dpto. de Biología Celular, Lab. Bioquímica Clínica y Molecular, Caracas, Venezuela.
13. González Paz R. J. (2007). *Caracterización de la interacción entre colágeno-hidroxiapatita y de una muestra compuesta pead-colágeno*. Universidad Simón Bolívar/Dpto. de Biología Celular. Introducción.

14. Mora Raimundo P. (2016). *Nanopartículas de Sílice Mesoporosa para Aplicaciones Biomédicas*. 1, 2, 17. Universidad Complutense.
15. Cai, Q., Luo, Z-S., Pang, W-Q., Fan, Y-W., Chen, X-H., Cui, F-Z. (2001). *Chem. Mater.* 13, 258-263.
16. Niederberger M., Garnweitner, G., Pinna, N., Antonietti, M. (2004). *Nonaqueous and Halide-Free Route to Crystalline BaTiO<sub>3</sub>, SrTiO<sub>3</sub>, and (Ba,Sr)TiO<sub>3</sub> Nanoparticles via a Mechanism Involving C-C Bond Formation*. Contribution from the Max-Planck-Institute of Colloids and Interfaces, Colloid Chemistry, D-14424 Potsdam, Germany, and Department of Inorganic Chemistry, Fritz Haber-Institute of the Max-Planck-Society, Faradayweg 4-6, D-14195 Berlin, Germany.
17. Stöber, Werner; Fink, Arthur; Bohn, Ernst (1968). *Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range*. *Journal of Colloid and Interface Science*. 26 (1): 62–69.
18. Dorozhkina, E. I. (2002). *Dorozhkin, S. V. Chemistry of Materials*, 14, 4267.
19. Smart, L. E.; Moore, E. A. (2012). *Solid State Chemistry, an introduction*; CRC Press.
20. International Centre for Diffraction Data <http://www.icdd.com> (8 de Xullo de 2017)
21. Programa Match! <http://www.crystalimpact.com/> (8 de Xullo de 2017).
22. Programa OMNIC Spectra <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/D22224~.pdf> (9 de Xullo de 2017)
23. Laudate, T. (2008). *Advanced Materials and Processes*. 1, 45.
24. <https://www.netzsch-thermalanalysis.com/us/products-solutions/simultaneous-thermogravimetry-differentialscanning-calorimetry/> (10 de Xullo 2017).
25. Elliott J. C. (1994). *Structure and Chemistry of the Apatites and the Other Calcium Orthophosphates*. Elsevier.
26. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/95904?lang=es&region=ES> (20 de Xullo de 2017).
27. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/652261?lang=es&region=ES> (20 de Xullo de 2017).

28. <http://fibrapoliuretano.blogspot.com.es/2013/05/punto-de-fusion.html> (20 de Xullo de 2017).
29. [http://www.asiquim.com/nwebq/download/HDS/Polietilenglicol\\_600.pdf](http://www.asiquim.com/nwebq/download/HDS/Polietilenglicol_600.pdf) (20 de Xullo de 2017).
30. [http://www.oxfordplasma.de/process/sio\\_dort.htm](http://www.oxfordplasma.de/process/sio_dort.htm) (20 de Xullo de 2017)
31. Liga Berzina-Cimdina and Natalija Borodajenko (2012). *Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Infrared Spectroscopy* - Materials Science, Engineering and Technology, Prof. Theophanides Theophile (Ed.)