

Bioactividad de hidroxiapatita obtenida a partir de cáscara de huevo para uso potencial como cemento óseo

Bioactivity of Hydroxyapatite Obtained From Eggshell for Potential use as Bone Cement

Karen García-Sánchez¹, Iber J. Quiñones², Jose Oscar Gutierrez-M.³, Ruben Camargo-Amado⁴
y Mónica J. Basante-Romo^{1,4}

Resumen

Los biomateriales se han constituido como una herramienta fundamental en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa, debido a que tratan y en algunos casos logran mimetizar el tejido original. Actualmente se estudian los cementos óseos como biomateriales sustitutos de hueso en diferentes patologías, y se analizan diferentes compuestos con contenido de hidroxiapatita para dotarlos de bioactividad. En el presente estudio se tuvo como objetivo evaluar el carácter bioactivo en muestras de hidroxiapatita obtenida a partir de cáscara de huevo para usarse como posible adición a los cementos óseos. La síntesis de la hidroxiapatita se realizó por el método de precipitación, en la que se usó el óxido de calcio proveniente de las cáscaras de huevo y el ácido fosfórico como fuentes de calcio y fósforo, respectivamente. La caracterización química realizada por medio de espectroscopia Raman y EDS, permitió evidenciar que se logró obtener hidroxiapatita a partir de éste residuo con una relación Ca/P de 2,187. Para el estudio de bioactividad, se sumergieron las muestras en polvo en un fluido biológico simulado durante 14 y 28 días, y con espectroscopia Raman y microscopía SEM-EDS, se caracterizaron las muestras tanto antes como después del tratamiento para determinar su relación Ca/P y comportamiento con el tiempo. Las técnicas de caracterización permitieron determinar que la hidroxiapatita de cáscara de huevo presenta propiedades bioactivas y que además es un material estable al estar en contacto con el fluido biológico simulado, una gran candidata para usarse como adición a los cementos óseos convencionales.

Palabras clave: Hidroxiapatita, Biomaterial, Cáscara de huevo, Bioactividad.

Abstract

Biomaterials have become a fundamental tool in tissue engineering and regenerative medicine because of their capacity to mimic the original tissue. Currently, bone cements are being studied as bone substitute biomaterials in different pathologies, also compounds with materials such as hydroxyapatite are analyzed to provide them bioactivity. In the present study, the main goal was to evaluate the bioactive nature of hydroxyapatite samples obtained from eggshells. Hydroxyapatite synthesis was performed by a wet chemical method, in which calcium oxide from eggshells and phosphoric acid were used as sources of calcium and phosphorus, respectively. The chemical characterization carried out by Raman spectroscopy and EDS showed that it was possible to obtain hydroxyapatite from this residue with a Ca/P ratio of 2,187. For the bioactivity study, the powder samples were immersed in simulated body fluid for 14 and 28 days. Before and after the treatment the samples were characterized to determine their Ca/P ratio and behavior over time by Raman spectroscopy, and SEM-EDS microscopy. The characterization techniques allowed us to know that hydroxyapatite synthesized from eggshells had bioactive properties. It is stable material in contact with the simulated body fluid, which suggests it is a great candidate to be used as an addition to conventional bone cement.

Keywords: Hydroxyapatite, Biomaterial, Eggshell, Bioactivity.

Recepción: 12-Nov-2021

Aceptación: 15-Dic-2021

¹Facultad de Ingeniería Biomédica, Universidad Autónoma de Occidente, Cali- Colombia.

Correo electrónico: karen.garcna@uao.edu.co

²Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA), Cali, Colombia. Correo electrónico: ijquinones@misena.edu.co

³Grupo de investigación Farmacología UNIVALLE, Escuela de Medicina, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Correo electrónico: jose.gutierrez@correounivalle.edu.co

⁴Físico-química de bio y Nanomateriales, Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Correo electrónico: ruben.camargo@correounivalle.edu.co, monica.basante@correounivalle.edu.co

1 Introducción

A nivel mundial es notable el incremento de la población con enfermedades que afectan el tejido óseo como la osteoporosis y la osteoartritis [1]. Sólo la osteoporosis causa más de 8,9 millones de fracturas al año, un promedio de una fractura osteoporótica cada 3 segundos [2]. Esto sin contar otro tipo de fracturas que se presentan por patologías diferentes a la osteoporosis. En cuando a la osteoartritis, según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD por sus siglas en inglés), la osteoartritis es una de las diez enfermedades más incapacitantes que se presentan en los países desarrollados. Alrededor del mundo, el 10% de los hombres y el 18% de las mujeres mayores de 60 años padecen osteoartritis, incluidas las formas moderadas y graves. La cirugía de reemplazo articular se considera la intervención más eficaz para artrosis severa y fracturas de cadera [3].

Los cementos óseos pueden indicarse para la fijación de prótesis a hueso vivo en intervenciones ortopédicas quirúrgicas musculoesqueléticas para tratar artritis reumatoide, artrosis, artritis traumática, anemia de células falciformes, osteoporosis, necrosis avascular, enfermedad del colágeno, destrucción articular importante como consecuencia de traumatismos u otras afecciones, revisión de una artroplastia anterior y fijación de fracturas patológicas [4]. También se utilizan en la reparación de defectos óseos en procedimientos como la reconstrucción craneal y del oído medio (5–7). Con el constante avance de la ciencia y la continua búsqueda de biomateriales para mejorar las propiedades de los cementos óseos, se ha seleccionado la HA como uno de los biomateriales con componente bioactivo, ideal para brindar a los cementos óseos dicha propiedad, de manera que todas sus propiedades y comportamientos como aditivo están siendo estudiadas (1,8–11).

En el 2017, los colombianos consumieron la cifra de 13.827 millones de unidades de huevos. Es decir, más de 1.150 millones de huevos al mes, mostrando un incremento del 7,7% en comparación al 2016, y ubicando al país en el tercer puesto en Latinoamérica después de México y Brasil [12]. En

China se produjeron 529 billones de huevos en 2017, y en Estados Unidos, 106,7 billones (unidades en inglés ($\times 10^9$)) [13], de manera que el huevo es un alimento que se consume en grandes cantidades a nivel mundial y así mismo, que produce abundancia de residuos que podrían ser aprovechados como materia prima para un producto de uso biomédico.

Existe la posibilidad de sintetizar hidroxiapatita a partir de una fuente natural, de un desecho como la cáscara de huevo de gallina (14–19) teniendo en cuenta su composición rica en Calcio [20], sin embargo, aunque hay numerosos estudios en los que se ha obtenido HA-h, hay pocos estudios documentados que hablan de la bioactividad de dicho material [21], se tienen preguntas en cuanto al comportamiento de este material en un ambiente fisiológico, de su grado de biocompatibilidad y bioactividad necesarias para aplicaciones biomédicas [22–24], en este caso, necesarias para determinar si es viable o no usar este material como aditivo para cementos óseos. Por lo tanto, en este trabajo se tuvo como objetivo evaluar el carácter bioactivo de muestras de HA-h para posible aplicación como cemento óseo.

2 Metodología

Este trabajo se divide en 2 partes, la primera es la síntesis y caracterización de la Hidroxiapatita sintetizada a partir de la cáscara de huevo de gallina (HA-h) y la segunda es la prueba *In Vitro* para determinar la bioactividad. Se comparó con la HA comercial (HA-c) marca Strem Chemicals CAS #: 7758-87-4.

2.1 Técnica de lavado de cáscara de huevo

El diseño consistió en realizar dos tipos de limpieza a las cáscaras de huevo: Se lavó 500 g de cáscaras de huevo únicamente con agua destilada, y otros 500 g con una mezcla de agua destilada y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30%. Se dejaron sumergidas en las soluciones por 1 hora y se lavaron al final con agua destilada nuevamente. Se secaron en un horno de convección forzada marca Jeio Tech modelo OF 22 G a 100 °C por 24 horas.

2.2 Molienda de cáscaras de huevo

Con el fin de determinar el tiempo más efectivo de molienda teniendo en cuenta que se necesitaban tamaños de partícula iguales o menores a 75 μm , se procedió a moler las cáscaras en un molino de bolas marca MRC, modelo RJM-103. Se realizaron moliendas introduciendo 400 g y 250 g de cáscaras por 4, 6 y 8 horas a 200 rpm.

2.3 Tamizado de partículas de cáscara de huevo

El material obtenido de la molienda, se separó en diferentes tamaños de partícula, utilizando una tamizadora RO-TAP con los tamices No. 100, 140, 200, 230 y 270 por 3 minutos. Se pesó el contenido de polvo que quedó en cada tamiz. Se realizó para cada tiempo de molienda.

2.4 Tratamiento térmico para obtener el óxido de calcio (CaO)

Se introdujeron en la mufla marca Terrigeno crisoles con las muestras del polvo de cáscara de huevo con tamaño de partícula igual o menor a 75 μm , ya que se ha demostrado que con polvo de tamaño 54 μm y 74 μm , se puede obtener CaO por medio de tratamiento térmico [25] y para aumentar el área superficial del material. Se realizaron dos tipos de tratamiento térmico, teniendo en cuenta las rampas de la bibliografía encontrada [26-28]:

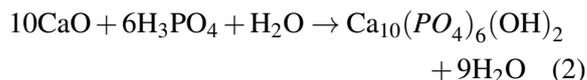
1. Se programó una velocidad de 5 °C/min hasta llegar a la temperatura de 450 °C, se mantuvo esta temperatura por 2 horas. Luego, con una velocidad de 0,5 °C/min, se llevó hasta 900 °C por 2 horas. El CaO obtenido por ésta rampa se llamó CaO₁.
2. Se programó una velocidad de 5 °C/min hasta llegar a 900 °C y se mantuvo en esta temperatura por 3 horas. El CaO obtenido por esta rampa se llamó CaO₂.

El carbonato de calcio se transformaba en óxido de calcio al liberar dióxido de carbono (CO₂) como se muestra en ecuación(1) [26].



2.5 Síntesis de la HA-h

Se realizó por precipitación, se dio la reacción descrita en la ecuación (2). Para los cálculos de tuvo en cuenta que la HA en fase pura tiene una relación Ca/P de 1,67 [29], relación estequiométrica que revela la estructura cristalina de apatita de la fórmula química de fosfatos de calcio [30].



$$\text{CaO} = \frac{56,0774 \text{ g}}{\text{mol}} \quad (3)$$

$$\text{Ca} = \frac{40,078 \text{ g}}{\text{mol}} \quad (4)$$

$$1,67 \text{ moles Ca} \frac{40,078\text{g}}{\text{mol}} = 66,93 \text{ g Ca} \quad (5)$$

$$\begin{aligned} 40,078\text{gCa} &\longrightarrow 56,0774\text{gCaO} \\ 66,93\text{gCa} &\longrightarrow X \end{aligned} \quad (6)$$

$$\begin{aligned} X &= \frac{66,93 \text{ g Ca} * 56,0774 \text{ g CaO}}{40,078\text{g Ca}} \\ &= 93,648 \text{ g CaO} \end{aligned} \quad (7)$$

$$P = \frac{30,973 \text{ g}}{\text{mol}} \quad (8)$$

$$P = \frac{30,973 \text{ g}}{\text{mol}} \quad (9)$$

$$\rho\text{H}_3\text{PO}_4 = \frac{1,88 \text{ g}}{\text{ml}}$$

$$\begin{aligned} \text{H}_3\text{PO}_4 \text{ para } 1 \text{ L} &= 97,994 \text{ g} \frac{\text{ml}}{1,88 \text{ g}} \\ &= 52,12\text{ml} \end{aligned} \quad (10)$$

Se adicionó 96,64 g de CaO₂ a 1 litro de agua destilada y agitó hasta obtener una mezcla

homogénea (los cálculos se describen en ecuación (3-7)). Mediante agitación constante se adicionó gota a gota 52,12ml de ácido fosfórico (H_3PO_4) (los cálculos se describen en ecuación (8-10)) [29, 31, 32]. Se midió el pH y dependiendo de su valor, se ajustó a 10 bien sea con hidróxido de amonio o con ácido clorhídrico [29, 31, 32]. Una vez el pH se encontró estable, se filtró al vacío y se secó en un horno a 80 °C durante 24 horas. El tratamiento térmico se realizó con temperaturas por debajo de la temperatura de sinterización de la HA (800 °C-1000 °C) [33, 34], normalmente de 500 °C [35-37]. Se maceró manualmente en un mortero. Se tamizó y dejó únicamente la HA-h con tamaño de partícula entre 63 μm y 75 μm . Estudios realizados en los que se añade HA como relleno inorgánico a los cementos óseos [28, 38-41], se utilizan tamaños de partícula entre 56 μm a 80 μm [8, 42].

2.6 Caracterización Espectroscopía Raman

Se utilizó el espectrofotómetro DXR SmartRaman de Thermo Scientific bajo la excitación del láser de longitud de onda 532nm, tiempo de exposición 10 seg, exposiciones de muestra 40. Se caracterizaron todas las muestras de CaO obtenidas luego del tratamiento térmico del polvo de cáscara de huevo (HA-h) y la HA comercial (HA-c), ambas antes y después de la prueba de bioactividad. Para verificar que el equipo estuviera funcionando correctamente, se analizó una muestra estándar de estireno antes de cada uso del equipo.

2.7 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para observar la morfología de la HA(43,44) y sus cambios luego de la prueba de bioactividad, se utilizó el equipo de microscopía electrónica SEM NeoScope JCM-5000. Se secaron las muestras a una temperatura de 80 °C durante toda una noche, luego se les realizó un recubrimiento con oro con un equipo Cressington Sputter Coater 108 auto y posteriormente se tomaron las imágenes.

2.8 Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS)

Para la composición química por elementos de las muestras de HA-c e HA-h antes y después de la

inmersión en fluido biológico simulado (SBF), se utilizó el equipo de SEM-EDS JEOL JSM6490LV. Para el recubrimiento con oro, se utilizó el equipo Denton Vacuum Desk IV.

Se realizó análisis EDS a las muestras de HA-c e HA-h antes de la inmersión en el SBF, y después de 28 días de inmersión. La medición se realizó en diferentes puntos de una muestra (mínimo 6) y los cálculos y análisis realizados a partir de los resultados obtenidos se hicieron con base en el promedio de dichos valores.

2.9 Medición de bioactividad in vitro

Se preparó el SBF teniendo en cuenta el método de preparación propuestos por Kokubo y Takadama [45]. En un vaso de precipitado de plástico de 1.000ml se preparó la solución, éste se encontraba dentro de un baño de agua que permitió controlar la temperatura de la solución de manera que no cambiara de forma brusca. Se calentó el agua contenida en el vaso de precipitado hasta $36,5 \pm 1,5$ °C. Se añadieron los reactivos siguiendo el orden del 1 al 8 en la Tabla 1.

Se agregó el reactivo Tris cuidadosamente hasta que la mezcla alcanzó un pH de $7,43 \pm 0,05$. Se mantuvo el pH en el rango de 7,42 a 7,45, ajustándolo con gotas de 1,0M-HCl. Se adicionaron ambos reactivos alternados cuidando el rango de pH, hasta que se completó la cantidad de 6,118g de Tris (Tabla 1). La solución se enfrió a 20 °C y se filtró al vacío con un filtro de 0,22 μm . La solución se guardó en una botella de plástico que fue sellada y conservada a 5 a 10 °C.

Tabla 1. Reactivos y cantidades a añadir para preparar 1L de SBF [45].

Orden	Reactivo	Cantidad	Pureza [%]
1	NaCl	8,035 g	99,5
2	NaHCO ₃	0,355 g	99,5
3	KCl	0,225 g	99,5
4	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0,231 g	99,0
5	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,311 g	98,0
6	1 _M -HCl	39 ml	-
7	CaCl ₂	0,292 g	95,0
8	Na ₂ SO ₄	0,072 g	99,0
9	Tris	6,118 g	99,0
10	1 _M -HCl	0 – 5ml	-

Para evaluar el comportamiento de la HA-h en

un ambiente fisiológico [45], se sumergieron dos muestras en polvo de 1g por triplicado de la HA-h y dos muestras de 1g de la HA-c en 30ml del SBF (como control positivo) por 14 y 28 días a 36,5 °C en una incubadora Fisher Scientific. Se realizó por triplicado.

Como control negativo se tuvo la misma cantidad

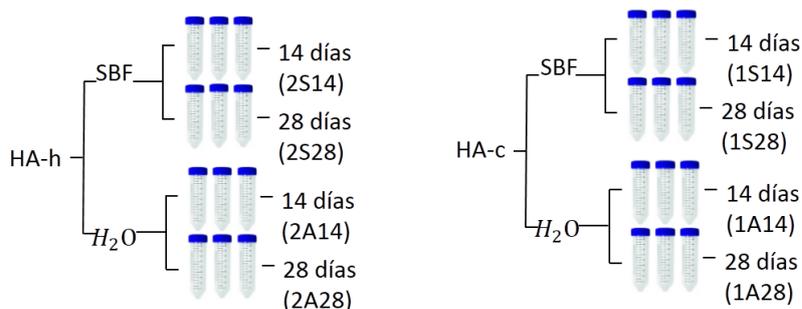


Figura 1. Nomenclatura de diseño experimental para realizar estudio de bioactividad a muestras de HA.

Posterior a la prueba de bioactividad. Se retiró el SBF con cuidado y las muestras se lavaron dos veces con agua destilada desionizada. Luego, se secaron a temperatura ambiente en cajas petri cubiertas con papel aluminio, con agujeros para permitir que pasara el aire.

3 Resultados y discusión

3.1 Análisis granulométrico por tamizado

Resultado de la molienda de 400 g de cáscaras a 4, 6 y 8 horas se obtuvo 23,97%, 26,1%, y 17,55% respectivamente. En la Figura 2, muestra la cantidad de material tamizado a las 6 horas que obtuvo mayor cantidad de material de interés (75, 63 y 53 μm). Se tomaron datos de 4 réplicas.

3.2 Tratamiento térmico para la obtención de óxido de calcio

En la literatura se reporta que las bandas de absorción presentadas en la longitud de onda 356 cm^{-1} , 653 cm^{-1} y 1.073 cm^{-1} , se presentan en función del contenido de óxido de calcio. La banda de absorción en 1.073 cm^{-1} muestra el estiramiento simétrica del anión carbonato, y las bandas en 653 cm^{-1} y 356 cm^{-1} a los enlaces Ca-O [45].

de muestras de HA-h y HA-c sumergidas en agua bajo las mismas condiciones que las experimentales (HA-h y HA-c sumergidas en SBF) y agua y SBF sin ningún material (para descartar algún tipo de contaminación en el medio). Los materiales fueron esterilizados en autoclave. La nomenclatura usada en el diseño experimental se describe en la Figura 1.

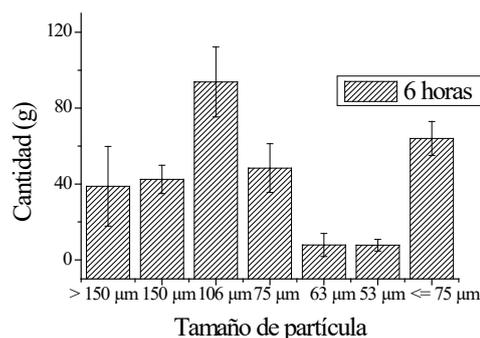


Figura 2. Cantidad promedio de material por tamaño de partícula con tiempo de molienda de 6 horas.

La Figura 3 muestra el espectro de los materiales obtenidos luego de someter el polvo de cáscaras de huevo lavadas con agua y lavadas con H_2O_2 . Con ambas rampas de temperatura se obtiene CaO, y el proceso de lavado de las cáscaras no influye en la obtención del material.

3.3 Análisis mediante Espectroscopia Raman

La Figura 4, muestra la comparación del espectro Raman de la HA-h, con el espectro de la HA-c. No existen diferencias significativas en ambos espectros Raman y la bibliografía consultada [47]. Se pudo determinar que se logró obtener una HA similar a la HA-c usando como precursor de calcio las cáscaras de huevo.

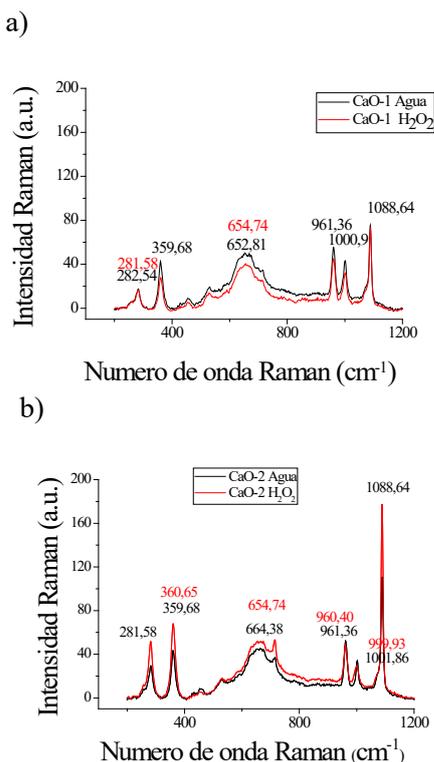


Figura 3. Espectro Raman del CaO. a) Rampa de temperatura 1. b) Rampa de temperatura 2.

El modo de estiramiento simétrico (ν_1) del enlace P-O del grupo fosfato (PO_4), aparece en $964,26 \text{ cm}^{-1}$ para la HA-h y en $963,29 \text{ cm}^{-1}$ para la HA-c, que es la banda de absorción de mayor intensidad y característico de la HA pura; el modo vibracional a $434,89 \text{ cm}^{-1}$ para la HA-h y a $432,96 \text{ cm}^{-1}$ para la HA-c, se atribuye a los modos de flexión simétrico del enlace O-P-O de PO_4 (ν_2); la banda de absorción presente en $1049,11 \text{ cm}^{-1}$ en ambos espectros, corresponde a vibraciones de estiramiento asimétricas de P-O (ν_3); y el modo de flexión asimétrico O-P-O (ν_4), se muestra en $593,99 \text{ cm}^{-1}$ para la HA-h, y en $593,03 \text{ cm}^{-1}$ para la HA-c [47-49].

3.4 Análisis mediante SEM

La Figura 5 muestra las imágenes de HA-c y HA-h a diferentes magnificaciones. Tanto la HA-c como la HA-h presentan una forma irregular de granos que forman aglomerados. Se logró obtener una HA-h con morfología y tamaños de grano semejantes a la HA-c.

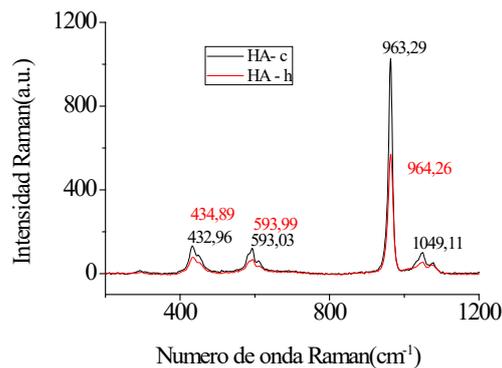


Figura 4. Espectro Raman de la HA comercial y la HA sintetizada a partir de cáscara de huevo.

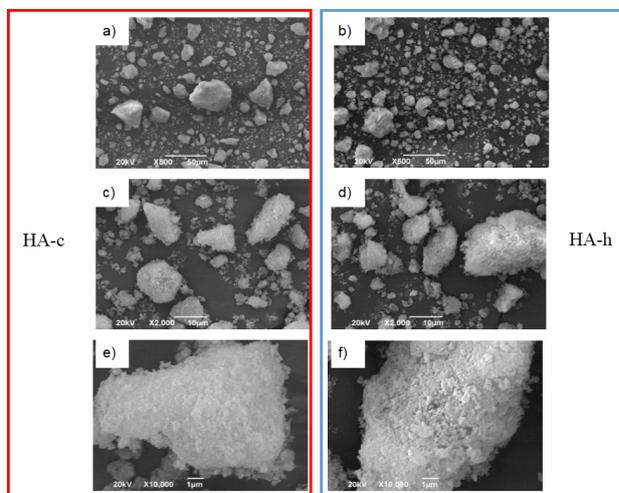


Figura 5. Microscopía SEM. HA-c: (a) 500X, (c) 2000X, (e) 10 000 X, HA-h: (b) 500X, (d) 2000X, (f) 10 000X.

3.5 Ensayo de bioactividad

La Figura 6 muestra los espectros Raman de las muestras usadas en el estudio de bioactividad con sus respectivas réplicas. Se observa que no hay presencia de nuevas bandas de absorción en el espectro Raman con respecto a las muestras antes de la inmersión, ni el agua ni el SBF alteraron la composición química de los materiales en cuestión, por lo que se dice que tanto la HA-c como la HA-h son estables.

En cuanto a los resultados visibles al momento de lavar las muestras que se encontraban en presencia del SBF, se observó que el tiempo de precipitado de la HA-h con respecto a la HA-c fue mayor debido a que la HA-h se suspendía más fácilmente en el medio que la HA-c.

La Figura 7 muestra las imágenes SEM de

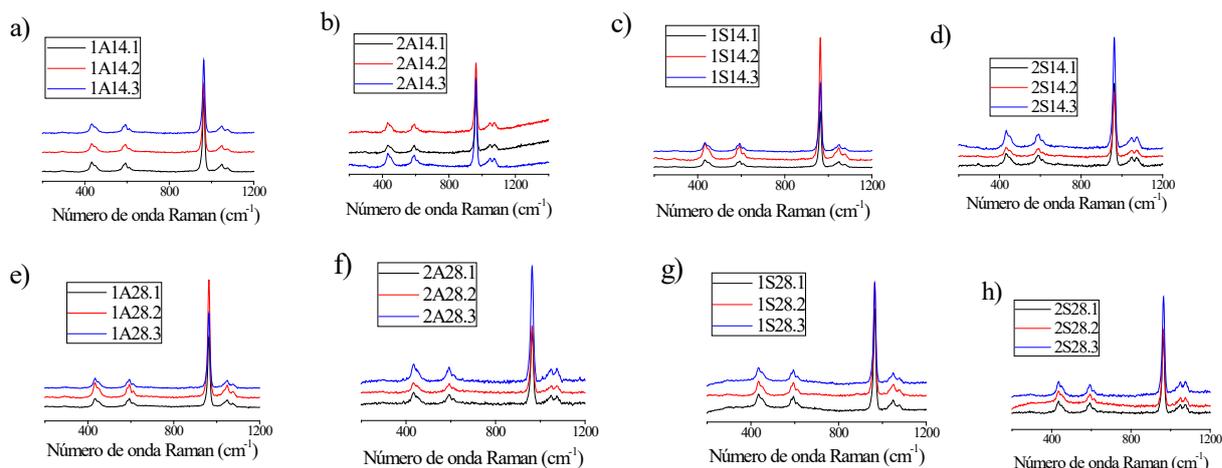


Figura 6. Espectros Raman de las muestras de HA-c e HA-h y sus réplicas, después de la inmersión en SBF.

las muestras luego de la inmersión en el SBF. La comparación de las imágenes tomadas con microscopía SEM e las muestras de HA-c y de HA-h se observa un grano de HA-c de 25 μm , que es muy similar al presentado en la Figura 7b) de HA-h, ambos granos antes de la inmersión en el SBF. En la Figura 7c), se muestra un aglomerado de partículas de 1S14, y en la Figura 7d), igualmente se presenta un aglomerado de partículas pero de 2S14. Así mismo, se muestra la similitud entre 1S28 y 2S28 en las Figura 7e), f), g) y h), donde se muestran ambos materiales a un aumento de 500X y 10 000X. Se observa tanto para HA-h como para la HA-c que exhiben la misma morfología antes y después de sumergirse durante 28 días en el SBF, y comparando a las dos HA se observa que son semejantes.

El comportamiento de la HA-h y HA-c se puede ver afectado gracias a que el ensayo de bioactividad se realizó en un SBF estático. Se ha demostrado que la capa de apatita formada sobre una superficie bioactiva en contacto con el SBF [50], es mayor en un sistema con SBF dinámico que en uno con SBF estático [51]. En las imágenes obtenidas mediante microscopía SEM, se logra observar la presencia de nuevas estructuras en la superficie de las muestras. Sin embargo, en algunas tomas no se alcanza a diferenciar microestructuralmente la formación de dichos fosfatos de calcio, esto puede deberse a que la formación de éstas estructuras se dio en pequeña proporción debido igualmente al ensayo de bioactividad en SBF estático [51].

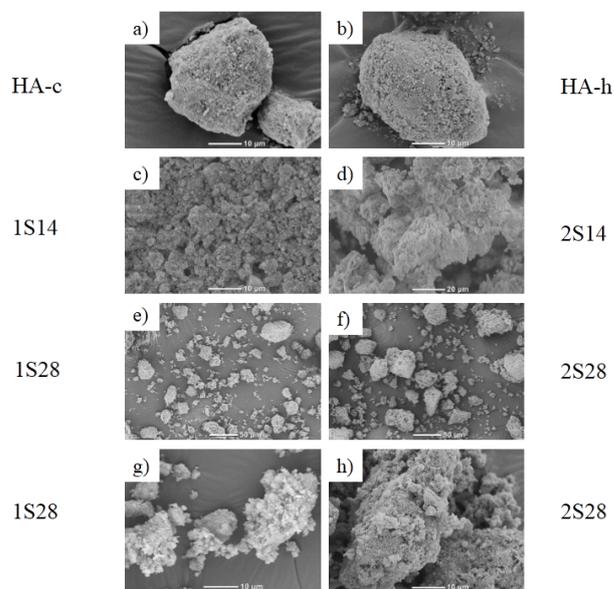


Figura 7. Microscopía SEM de HA. (a)HA-c antes de la inmersión en SBF, (b) HA-h antes de la inmersión en SBF, (c) 1S14, (d) 2S14, (e) 1S28 a 500X, (f) 2S28 a 500X, (g) 1S28 a 10 000X, (h) 2S28 a 10 000X.

El análisis EDS permitió observar que los elementos químicos de interés presentes en las muestras fueron los mismos tanto antes como después de la inmersión en SBF (Figura 8). No se encontraron elementos adicionales luego del estudio de bioactividad que pudieran dar evidencia de generación de materiales tóxicos para el organismo.

Mediante la espectroscopía EDS [52, 53], pudo notarse que los principales componentes de las muestras son Ca, P y O, elementos que conforman la

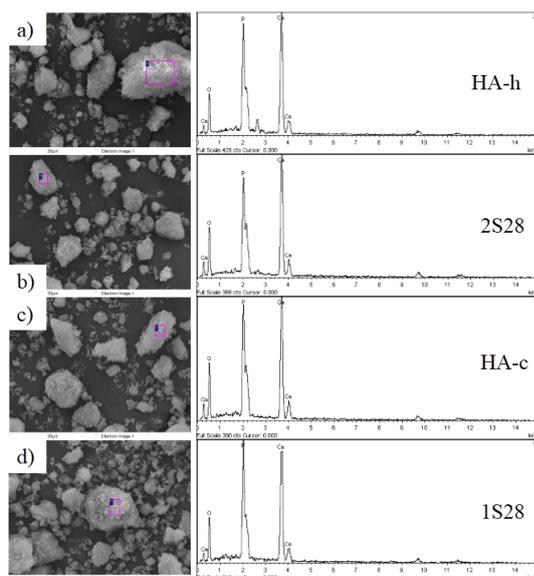


Figura 8. Comparación SEM-EDS en muestras de (a) HA-h, (b) 2S28, (c) HA-c, (d) 1S28.

fórmula química de la HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) y en comparación con la HA-c presenta valores similares (Figura 8a) y c)). En la Figura 8a) (HA-h), se observa un pico adicional alrededor de 2,6keV, que corresponde al Cl [54]. Podría deberse a que dicho elemento se encuentra presente en el material gracias al uso de HCl durante el proceso de síntesis. Como se observa, luego de la inmersión en el SBF (Figura 8b)), dicho pico se muestra casi imperceptible en el análisis composicional del material, debido a que a las muestras se les realiza varios lavados al final del estudio de bioactividad, lo que indica que un proceso de lavado adicional al final de la síntesis, podría eliminar el cloro presente en el material.

Se determinó que la relación Ca/P de la HA-c era de 2,0766, y la de la HA-h sintetizada de 2,1875. El comportamiento en la prueba de bioactividad de la HA-h en comparación con la HA-c presentó resultados similares. Durante la prueba, la relación Ca/P disminuye en el tiempo en porcentaje de 0,02% tanto para HA-h como para HA-c (ver Tabla 2). Con dicho cambio, la relación Ca/P de ambas muestras se acercan más a 1.67 que corresponde a la relación Ca/P de la HA pura, cambio que puede atribuirse a la formación de nuevas estructuras apatíticas en ambas muestras. Al final de la prueba de bioactividad (28 días), la relación Ca/P de la HA-h es mayor que la de HA-c con una diferencia de 0,1087.

Tabla 2. Análisis relación Ca/P obtenido mediante EDS.

Material	% O	% P	% Ca	Ca/P
HA-c	50,59	16,06	33,35	2,0766
1S28	52,8	15,52	31,68	2,0412
HA-h	54,77	14,19	31,04	2,1875
2S28	53,76	14,68	31,56	2,1499

El O, P y Ca son elementos que permiten una interacción con el hueso y definen su bioactividad, por lo que la HA-h con una relación Ca/P de 2,14 se comportaría de forma estable, permitiría la interacción y unión con el tejido óseo y no presentaría reacciones adversas producto de la generación de nuevas sustancias o enlaces con los iones corporales.

De acuerdo con el autor Raii [30], la pureza de la HA depende de la razón Ca/P que presente, que debe ser mayor o igual a 1,67. La relación estequiométrica Ca/P de 1,67 revela la estructura cristalina de apatita de la fórmula química de fosfatos de calcio, mientras las relaciones Ca/P menores a 1,67, se asignan a estructuras cristalinas del complejo de fosfato de calcio no apatíticas para minerales de fosfato más solubles [30]. Por lo tanto, la HA-h obtenida presenta características de alta pureza e insolubilidad y esto la hace un material bioactivo. Sin embargo, se recomienda hacer una caracterización mediante Difracción de Rayos X para establecer su cristalografía.

4 Conclusiones

El estudio de bioactividad y la posterior caracterización de la HA-h permiten determinar que dicho material presenta propiedades bioactivas que lo hace un gran candidato para usarse como adición a los cementos óseos y dotarlos de bioactividad.

Se logró determinar mediante el análisis composicional de las muestras estudiadas por EDS que la HA-h tiene una composición de elementos muy similar a la de la HA-c y que se comportan de igual forma en presencia del fluido biológico simulado. Se determinó que la relación de Ca/P disminuye en porcentaje de 0,02% en el tiempo de estudio (28 días) tanto para HA-h como para HA-c. La relación Ca/P de la HA-c fue de 2,0766, y la de

la HA-h sintetizada de 2,1875, con una diferencia de 0,1109. La HA-h obtenida con una relación Ca/P de 2,1875 se comportaría de forma estable, permitiría la interacción y unión con el tejido óseo y no presentaría reacciones adversas producto de la generación de nuevas sustancias o enlaces con los iones corporales.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia, tecnología e Innovación (MINCIENCIAS), al Tecnoparque nodo Cali del Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA), la Universidad del Valle y a la Universidad Autónoma de Occidente en Colombia.

Referencias

- [1] Hernández ML, González Santos R. Cementos óseos acrílicos modificados con hidroxiapatita para implantes óseos. *CENIC Ciencias Biológicas*, vol. 37, no. 2, pp. 111-2, 2006.
- [2] International Osteoporosis Foundation. Facts and Statistics | International Osteoporosis Foundation.
- [3] OECD. Hip and Knee Replacement. Heal a Glance 2017 OECD Indic., pp. 178-9, 2017.
- [4] Orthopedics M. Cemento Óseo Radiopaco Orthoset® 150812-0. Arlington, 2013.
- [5] Luryi A, Bulsara K, Michaelides E. Hydroxyapatite bone cement for suboccipital retrosigmoid cranioplasty: A single institution case series. *Am. J. Otolaryngol Neck. Med. Surg.*, no. 38, pp. 390-3, 2017.
- [6] Galy-Bernadoy C, Akkari M, Mondain M, Mathiolon C, Uziel A, Venail F. Comparison of early hearing outcomes of type 2 ossiculoplasty using hydroxyapatite bone cement versus other materials. *Eur. Ann. Otorhinolaryngol Head Neck Dis.*, no. 131, pp. 289-92, 2014.
- [7] Pitiot V, Hermann R, Coudert A, Truy E. Lysis of the long process of the incus secondary to vibrant SounBridge1 middle ear implants, treated with hydroxyapatite bone cement. *Auris Nasus Larynx*. 2019.
- [8] Guerra NB, Hernández ML, Santos RG. Cementos Óseos Acrílicos Modificados con Hidroxiapatita / Acetato de Vinilo . Caracterización Mecánica, Termoanalítica y Bioactividad In Vitro Acrylic Bone Cement Modified whit Hydroxiapatyte / Vinyl Acetate. *Mechanical. Polímeros*, vol. 20, no. 2, pp. 98-106, . 2010.
- [9] Vargas Coronado R, Cervantes J, Cauch Rodríguez J, Vera Graciano R, Martínez Richa A. Estudio de las propiedades de cementos óseos preparados con metacrilatos funcionalizados e hidroxiapatita. *Rev. Mex. Ing. Biomédica*, vol. XXII, no. 2, pp. 54-60, 2001.
- [10] Coronado R., Chan Chan L., Cervantes J., Cauch Rodríguez J., Piña Barba MC. Characterization of Bone Cements Prepared with either Hydroxyapatite, α -TCP or Bovine Bone. *Rev. Mex. Ing. Biomédica*, vol. no. 1, pp. 89-96, 2013.
- [11] Morejón Alonso L, Mendizábal Mijares E, Delgado García JA, Davidenko N, Quiroz Farias A, Olmos Gómez MA. Cementos óseos acrílicos modificados con hidroxiapatita. Parte I. Cinética de polimerización. *Rev CENIC Ciencias Químicas*, vol. 37, no. 2, pp. 101-6, 2006.
- [12] aviNews. Fenavi, Consumo histórico de huevo y pollo en Colombia. 2018.
- [13] Statista. Leading egg producing countries worldwide, 2017 | Statistic.
- [14] Ouassel S, Chegrouche S, Nibou D, Melikchi R, Aknoun A, Mellah A. Application of response surface methodology for uranium(VI) adsorption using hydroxyapatite prepared from eggshells waste material: Study of influencing factors and mechanism. *Water Sci. Technol.* 2021.
- [15] Oladele IO, Agbabiaka OG, Adediran AA, Akinwekomi AD, Balogun AO. Structural

- performance of poultry eggshell derived hydroxyapatite based high density polyethylene bio-composites. *Heliyon*. 2019.
- [16] Mignardi S, Archilletti L, Medeghini L, De Vito C. Valorization of Eggshell Biowaste for Sustainable Environmental Remediation. *Sci. Rep.* 2020.
- [17] Shi D, Tong H, Lv M, Luo D, Wang P, Xu X, et al. Optimization of hydrothermal synthesis of hydroxyapatite from chicken eggshell waste for effective adsorption of aqueous Pb(II). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2021.
- [18] Sangmala A, Naemchanthara P, Limsuwan P, Naemchanthara K. Replacement of hydroxyapatite from chicken eggshell waste for ceramic properties improvement. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* 2021.
- [19] Rahman MM, Netravali AN, Tiimob BJ, Apalangya V, Rangari VK. Bio-inspired “green” nanocomposite using hydroxyapatite synthesized from eggshell waste and soy protein. *J. Appl. Polym. Sci.* 2016.
- [20] Milbradt BG, Müller ALH, da Silva JS, Lunardi JR, Milani LIG, De Moraes Flores ÉM, et al. Casca de ovo como fonte de cálcio para humanos: Composição mineral e análise microbiológica. *Cienc. Rural*, vol. 45, no. 3, pp. 560-6, 2015.
- [21] Sultana S, Hossain MS, Mahmud M, Mobarak M Bin, Kabir MH, Sharmin N, et al. UV-assisted synthesis of hydroxyapatite from eggshells at ambient temperature: cytotoxicity, drug delivery and bioactivity. *RSC. Adv.* 2021.
- [22] Patel DK, Kim MH, Lim KT. Synthesis and Characterization of Eggshell-Derived Hydroxyapatite Bioceramics. *J Biosyst Eng.* 2019.
- [23] Atiyah AG, AL-Falahi NH, Farhan FK. Synthesis and structure of eggshell hydroxyapatite bone implant. *Online Journal of Veterinary Research.* 2018.
- [24] Afriani F, Siswoyo, Amelia R, Hudatwi M, Zaitun, Tiandho Y. Hydroxyapatite from natural sources: Methods and its characteristics. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* 2020.
- [25] Arboleda A, Franco M, Caicedo J, Tirado L, Goyes C. Synthesis and chemical and structural characterization of hydroxyapatite obtained from eggshell and tricalcium phosphate. *Ing. y Compet.*, vol. 18, no. 1, p. 69, 2016.
- [26] Rivera EM, Araiza M, Brostow W, Castano VM, Hernandez R, Rodriguez JR. Synthesis of hydroxyapatite from eggshells. pp 128-34, 1999.
- [27] Vélez J, Cardona N, Gómez J, López E. Síntesis de hidroxiapatita por combustión a partir del carbonato de calcio obtenido de cáscaras de huevo de gallina. *Rev. Colomb. Mater.* no. 5, pp. 97-102.
- [28] Trakoolwannachai V, Kheolamai P, Ummartyotin S. Development of hydroxyapatite from eggshell waste and a chitosan-based composite: In vitro behavior of human osteoblast-like cell (Saos-2) cultures. *Int. J. Biol. Macromol.*, no. 134, pp. 557-64, 2019.
- [29] Bee SL, Hamid ZAA. Hydroxyapatite derived from food industry bio-wastes: Syntheses, properties and its potential multifunctional applications. *Ceram Int [Internet]*, vol. 46, no. 11, pp. 17149-75, 2020. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.04.10330>.
- [30] Raii M. Formulation, characterization and implementation of Permeable Reactive Barrier (PRB) made of calcium phosphate. 2013.
- [31] Lee SJ, Oh SH. Fabrication of calcium phosphate bioceramics by using eggshell and phosphoric acid. *Mater. Lett.* 2003.
- [32] Dadhich P, Das B, Pal P, Srivas PK, Dutta J, Ray S, et al. A Simple Approach for an Eggshell-Based 3D-Printed Osteoinductive Multiphasic Calcium Phosphate Scaffold. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016.

- [33] Orozco J, Zuluaga IM, Forero P, Arango JA, Parra ER. Síntesis y caracterización de la hidroxiapatita natural obtenida del hueso de cerdo. *Rev. Colomb. Mater.* 2013.
- [34] Orozco Cardona JC, Marino Zuluaga I, Forero Sossa PA, Arango Arango PJ, Restrepo Parra E. Síntesis y caracterización de la Hidroxiapatita Natural obtenida del hueso de cerdo. *Rev. Colomb. Mater.* 2014.
- [35] Villora JM, Callejas P, Barba MF. Métodos de síntesis y comportamiento térmico del Hidroxiapatito. *Bol la Soc Esp Ceram y Vidr.*, vol. 41, no. 5, pp. 443-50 2002.
- [36] Gross Ka, Chai Cs, Kannangara Gsk, Ben-Nissan B, Hanley L. Thin hydroxyapatite coatings via sol-gel synthesis. *J. Mater. Sci. Mater Med.*, vol. 9, no. 12, pp. 839-43, 1998.
- [37] Okada M, Matsumoto T. Synthesis and modification of apatite nanoparticles for use in dental and medical applications. Elsevier. no. 51, pp. 85-95, 2015.
- [38] Agbabiaka OG, Oladele IO, Akinwekomi AD, Adediran AA, Balogun AO, Olasunkanm OG, et al. Effect of calcination temperature on hydroxyapatite developed from waste poultry eggshell. *Sci. African.* 2020.
- [39] Ummartyotin S, Manuspiya H. A critical review of eggshell waste: An effective source of hydroxyapatite as photocatalyst. *J. Met. Mater. Miner.* no. 40, 2018.
- [40] Okur M, Koyuncu DDE. The evaluation of hydroxyapatite synthesized from waste eggshell in the adsorption of Remazol N.Blue RGB dye. *J. Fac. Eng. Archit. Gazi. Univ.* no. 41, 2020.
- 2018; Trakoolwannachai V, Kheolamai P, Ummartyotin S. Characterization of hydroxyapatite from eggshell waste and polycaprolactone (PCL) composite for scaffold material. *Compos. Part. B Eng.* 2019.
- [41] Guerra NB, López M, González R. Cementos óseos acrílicos modificados con acetato de vinilo . Caracterización físico química , mecánica y microestructural. *Rev. CENIC Ciencias Químicas*, vol. 39, no. 2, 2008.
- [42] Khalid M, Jikan SSB, Adzila S, Murni Z, Badarulzaman NA, Rosley R, et al. Synthesis and characterizations of hydroxyapatite using precursor extracted from chicken egg shell waste. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 2022.
- [43] Alhussary B, A.Taqa G, Taqa A. Preparation And Characterization Of Natural Nano Hydroxyapatite From Eggshell And Seashell And Its Effect On Bone Healing. *J. Appl. Vet. Sci.* 2020.
- [44] Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials.* vol. 27, no. 15, pp. 2907-15, 2006.
- [45] Galvan-Ruiz M, Baños L, Rodriguez-Garcia ME. Lime characterization as a food additive. *Sens. Instrum. Food Qual Saf.*, vol. 1, no. 4, pp. 169-75, 2007.
- [46] Anjaneyulu U, Pattanayak DK, Vijayalakshmi U. Snail Shell Derived Natural Hydroxyapatite: Effects on NIH-3T3 Cells for Orthopedic Applications. *Mater. Manuf. Process.*, no. 31, pp. 206-16, 2016.
- [47] Ciobanu CS, Iconaru SL, Massuyeau F, Constantin LV, Costescu A, Predoi D. Synthesis, structure, and luminescent properties of europium-doped hydroxyapatite nanocrystalline powders. *J Nanomater.* 2012, 2012 (February).
- [48] Ferro AC, Guedes M. Mechanochemical synthesis of hydroxyapatite using cuttlefish bone and chicken eggshell as calcium precursors. *Mater. Sci. Eng. C.*, no. 97(May 2018), pp. 124-40, 2019.
- [49] Fernández Abreu ME, Alves Junior C, González Ruíz JE, Valin Fernández M, Valin Rivera JL. Determinación de la bioactividad de capas de alginato de sodio en discos de hidroxiapatita TT-Determination

of bioactivity in sodium alginate layers of hydroxyapatite disks. *Rev. Cuba Investig. Biomédicas*. 2014.

[50] Martín Barral AI. Bioactividad y biocompatibilidad de materiales sol-gel con contenido constante en CaO. no. 12-13, p. 52, 2005.

[51] De Lima IR, Freitas GCDFD, Pereira ECLPL, Loesh LFLF, Da Silva FASS, Da Silva HS da SS, et al. Síntese E Caracterização Físico-Química De Hidroxiapatita Recoberta Com Nanopartícula De Prata (AgNPs) para regeneração óssea guiada. *Rev Mundi Eng Tecnol e Gestão (ISSN 2525-4782)*. 2019.

[52] Rodrigues E, Brasil H, Barros T, Pereira C, Reis MAL dos, Almeida O. Síntese e caracterização do material hidrotalcita-hidroxiapatita dopado com nanotubos de carbono e sua aplicação na catálise da reação de transesterificação. *Cerâmica*. 2018.

[53] Centeno SA, Schulte F, Kennedy NW, Schrott AG. The formation of chlorine-induced alterations in daguerreotype image particles: A high resolution SEM-EDS study. *Appl. Phys. A Mater Sci. Process*, vol. 105, no. 1, pp. 55-63, 2011.