

**SÍNTESIS DE NANOHIPOXIPATITA DOPADA CON IONES ESTRONCIO: INFLUENCIA DEL Sr<sup>2+</sup> EN LAS PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE LAS NANOPARTÍCULAS Y DE BIOMATERIALES CERÁMICOS MICROPOROSOS**

**SYNTHESIS OF NANOHYDROXIAPATITE DOPED WITH STRONTIUM IONS: INFLUENCE OF Sr<sup>2+</sup> ON THE STRUCTURAL PROPERTIES OF NANOPARTICLES AND MICROPOROUS CERAMIC BIOMATERIALS**

Lizette Morejón Alonso<sup>a\*</sup> (0000-0001-9150-528X)  
Sheyla Bermúdez Pérez<sup>b</sup> (0000-0002-3842-1316)  
José Angel Delgado García-Menocal<sup>c</sup> (0000-0001-9079-7233)  
Eduardo Mendizábal Mijares<sup>d</sup> (0000-0003-4672-2052)

<sup>a</sup> Centro de Biomateriales (BIOMAT) La Habana, Cuba.

<sup>b</sup> Centro de Estudios Avanzados de Cuba (CEA) La Habana, Cuba.

<sup>c</sup> Universidad Internacional de Catalunya (UIC) (UIC), Barcelona, España.

<sup>d</sup> Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI, UdG), Guadalajara, México.

\* lizette.morejon@gmail.com

Recibido: 07 de noviembre de 2022;

Acceptado: 21 de diciembre de 2022;

**RESUMEN**

En la actualidad la hidroxiapatita funcionalizada con iones (HA-X) permite el desarrollo de nuevas propuestas de implantes biomédicos con mayor similitud a la hidroxiapatita natural, algunos de estos iones incentivan procesos biológicos para la osteointegración temprana de los implantes. En particular, el dopaje con Sr<sup>2+</sup> resulta de interés por el papel dual conocido de este ion de incidir en el metabolismo óseo favoreciendo la osteosíntesis y a la vez limitando la osteoclastia. Este trabajo evalúa la efectividad de la síntesis por vía húmeda acoplada a ultrasonido para la obtención de HA-Sr con 0, 10, 20% molar de sustitución del ion Ca<sup>2+</sup>. Las partículas se caracterizaron por Espectroscopia Infrarroja, Difracción de Rayos-X, Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos-X y Dispersión de Luz Dinámica. Se prepararon cerámicas a partir de las apatitas sintetizadas por sinterización a 900 °C/6 h, las cuales se analizaron por Microscopía Electrónica de Barrido y se estudió su bioactividad *in vitro* por inmersión en solución de Fluido Fisiológico Simulado. Los resultados obtenidos indicaron buena eficacia de la metodología utilizada en la obtención de las HA-Sr. Se detectó que las partículas resultaron nanométricas, que con la incorporación de Sr<sup>2+</sup> los tamaños de cristalito disminuyen desde ~50nm a ~30nm, la fracción de cristalinidad disminuye casi en un 80% (desde 74,3% a 12,5%), mientras incrementó el volumen de la celda unidad. La presencia de Sr<sup>2+</sup> en la hidroxiapatita aumentó significativamente la contracción de las piezas cerámicas por lo cual disminuyó su porosidad total. A la vez, aumentó el tamaño de los granos cerámicos, disminuyó las dimensiones de poros e hizo estrecha sus distribuciones. Se demostró que la presencia de Sr<sup>2+</sup> acelera la bioactividad de las cerámicas lo que hace a estas cerámicas apropiadas para su interacción con el tejido óseo vivo.

**Palabras claves:** Hidroxiapatita sustituida con Sr<sup>2+</sup>; biomateriales para el tejido óseo, estroncio, bioactividad.

**ABSTRACT**

At present, ion-functionalized hydroxyapatite (HA-X) allows the development of new proposals for biomedical implants with greater similarity to natural hydroxyapatite, while some of these ions encourage biological processes for early implant osseointegration. In particular, doping with Sr<sup>2+</sup> is very interesting due to the known dual role of this ion of influencing bone metabolism, favoring osteosynthesis and, at the same time, limiting osteoclastia. This work evaluates the effectiveness of the wet synthesis coupled to ultrasound to obtain HA-Sr with 0, 10, 20% molar substitution of the Ca<sup>2+</sup> ion. The particles were characterized by Infrared Spectroscopy, X-Ray Diffraction, X-Ray Photoelectron Spectroscopy and Dynamic Light Scattering. Ceramics were prepared from the synthesized apatites by sintering at 900 °C/6 h, which were analyzed by Scanning Electron Microscopy and their *in vitro* bioactivity was studied by immersion in Simulated Body Fluid solution. The results obtained indicated good efficacy of the methodology used to obtain the HA-Sr. It was detected that particles were nanometric, that with the incorporation of Sr<sup>2+</sup> the crystallite sizes decrease from ~50nm to ~30nm, the crystallinity fraction decreases by almost 80% (from 74.3% to 12.5%), while the volume of the unit cell increased. The presence of Sr<sup>2+</sup> in the hydroxyapatite significantly increased the shrinkage of the ceramic pieces and decreased their total porosity. At the same time, it increased the size of the ceramic grains, decreased the dimensions of the pores and narrowed their distributions. It was also shown that the presence of Sr<sup>2+</sup> accelerates the bioactivity of ceramics, making them suitable for interaction with the living bone tissue.

**Keywords:** Sr-substituted hydroxyapatite; bone tissue biomaterials; strontium, bioactivity.

## INTRODUCCIÓN

La búsqueda de materiales sustitutivos del tejido óseo constituye hoy día una de las temáticas de mayor actividad para la Ingeniería Biomédica. Diferentes investigaciones se realizan con el objetivo de encontrar un biomaterial en una estructura 3D que permita al unísono: restablecer la continuidad del tejido óseo lesionado sin provocar eventos adversos (biocompatibles), cumplimentar las exigencias mecánicas del sitio de implante (biofuncionales), acelerar los procesos de osteosíntesis y contribuir a la formación de nuevos vasos sanguíneos; implantes que además, se osteointegren totalmente con el paso del tiempo o puedan reabsorberse dejando paso al tejido neoformado, e incluso, que puedan liberar sustancias biológicamente activas para contrarrestar diferentes patologías (Jodati, Yilmaz, & Evis, 2020; P. Kumar et al., 2020; L. Morejón et al., 2019; Pupilli et al., 2022). El desafío es extremadamente grande, imitar a la naturaleza con su gran diversidad de variables biológicas hace que se investigue hoy en implantes personalizados con gran multiplicidad de propuestas.

La hidroxiapatita sintética estequiométrica, de fórmula:  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  (HA), al ser análoga al componente inorgánico fundamental de huesos y dientes de los vertebrados constituye, desde hace ya medio siglo, uno de los biomateriales de elección para la fabricación de implantes óseos. Su alta biocompatibilidad con el tejido vivo (Dorozhkin, 2008), su capacidad para enlazarse directamente al hueso circundante sin una interfaz (bioactividad) (Dorozhkin, 2013) y sus propiedades de osteoconducción (LeGeros, 2002) y osteoinducción (LeGeros, 2008) han sustentado los excelentes resultados en aplicaciones en Estomatología, Ortopedia, Neurocirugía o Cirugía Máxilofacial (Dorozhkin, 2018; Du, Chen, Liu, Xing, & Song, 2021).

No obstante, existen diferencias entre la hidroxiapatita sintética pura y la apatita biológica, pues esta última, posee dimensiones nanométricas y muy baja cristalinidad aspectos que le confieren una mayor solubilidad que permite al hueso, como importante reservorio de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ , mantener la homeostasis de estos elementos en el medio biológico. Además, la apatita biológica no es estequiométrica como la sintética, la cual posee una relación molar Ca/P exacta de  $10/6=1,67$ , ya que su estructura cristalina puede acomodar otros iones. Entre los iones que se acomodan de forma natural en la apatita biológica destacan: en sustitución del  $\text{Ca}^{2+}$ , cationes monovalentes como  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  o divalentes como  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$ ; en sustitución de los grupos  $\text{PO}_4^{3-}$ , aniones como  $\text{CO}_3^{2-}$  y en sustitución de los grupos  $\text{OH}^-$  aniones como  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  ó  $\text{F}^-$  (Elliott, 2013; Liu, Huang, Matinlinna, Chen, & Pan, 2013).

Una vía abordada en la actualidad para reproducir sintéticamente a la hidroxiapatita natural con sus cualidades de ser nanométrica, de baja cristalinidad y con iones y/o vacancias estructurales es la utilización de iones de dopaje incorporados a expreso a la estructura de la HA (Pu'ad, Koshy, Abdullah, Idris, & Lee, 2019). Pero a la vez, el dopaje constituye un camino para la incorporación de especies químicas en este biomaterial capaces de estimular procesos de osteosíntesis, de angiogénesis, de reducir la actividad osteoclástica o lograr actividad antibacteriana, antifúngica o antitumoral, entre otras muchas variantes (Šupová, 2015). No solo se ha explorado la inclusión de un único dopante sino que se investiga la inclusión de multicomponentes en la búsqueda de sinergia en las propiedades finales del dispositivo médico (Gaddam et al., 2022; Vukomanovic et al., 2022).

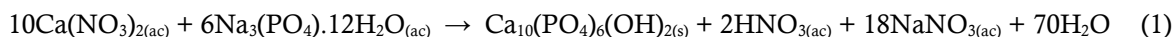
El estroncio, como ion divalente puede sustituir al ion calcio y acomodarse en su estructura, de ahí que la hidroxiapatita natural puede incorporarlo directamente a partir de la ingesta de alimentos, suplementos o medicamentos ricos en  $\text{Sr}^{2+}$  con efectos positivos demostrados en el tratamiento de Osteoporosis, Osteoartritis u Osteopenia (Baier et al., 2013). Se ha demostrado que, al igual que el  $\text{Ca}^{2+}$ , el  $\text{Sr}^{2+}$  en el metabolismo óseo media funciones celulares clave en células de osteoblastos y osteoclastos, entre ellas: el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis, y a la vez, estimula la osteosíntesis mientras que simultáneamente inhibe la osteoclastia (Bonnelye, Chabadel, Saltel, & Jurdic, 2008), efectos ambos, favorables para la restauración ósea. Por esta razón, ha sido explorada la obtención de HA-Sr a partir de diferentes procedimientos de síntesis y con diferentes contenidos del ion dopante desde concentraciones mínimas hasta un 100% de sustitución del ion  $\text{Ca}^{2+}$  (Edwin & Wilson, 2019; Frasnelli et al., 2017). A la fecha existe consenso en que las HA-Sr han demostrado mejores resultados en comparación que sus homólogos sin dopar tanto en ensayos de cultivos celulares *in vitro* como en estudios de implantación *in vivo* en diferentes modelos animales en términos de bioactividad, proliferación celular, curación ósea y osteointegración (Baier et al., 2013; Xue et al., 2006).

Este trabajo investiga la efectividad de la inclusión del ion  $\text{Sr}^{2+}$  en la estructura de la HA a través de la técnica de síntesis de precipitación por vía húmeda con auxilio de ultrasonido basado en antecedentes de la efectividad de la síntesis de nanohidroxiapatita pura por esta metodología (Fernandes Cóta et al., 2016; J. Lunz et al., 2015). Se evalúa el efecto del dopaje resultante en las propiedades de la celda cristalina de la hidroxiapatita, así como, su influencia en las características de cerámicas microporosas diseñadas para aplicaciones biomédicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Síntesis y caracterización de hidroxiapatita sin y con dopaje de iones de Sr<sup>2+</sup>

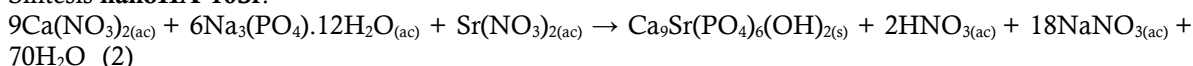
*Síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita:* La síntesis de hidroxiapatita nanométrica sin dopaje (**nanoHA**) se llevó a cabo a partir de la reacción entre los iones de una disolución de fosfato de sodio dodecahidratado, Na<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>).12H<sub>2</sub>O<sub>(ac)</sub> (p.a, Merck, Alemania) como fuente precursora de iones fosfato y una disolución de nitrato de calcio, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>(ac)</sub> (p.a, Merck, Alemania) como precursora de iones calcio en una relación molar Ca/P de 1,67 a través de siguiente reacción química:



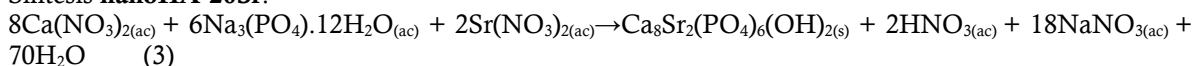
Para ello se adicionó lentamente (0,5mL/min) la disolución de Na<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>).12H<sub>2</sub>O<sub>(ac)</sub> sobre la disolución de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2(ac)</sub> en recipiente cerrado dentro de baño ultrasónico (Branson 3200, Alemania). Se aplicó por intervalos 10 min de ultrasonido y 10 min de adición sin ultrasonido para evitar el calentamiento de la solución y se repitió el procedimiento hasta acabar la disolución de fosfato. Al finalizar se aplicaron 10 min extras de ultrasonido. Se controló que el pH final de la reacción fuera mayor que 10. Se dejó envejecer la disolución por 72 horas, se separó la solución sobrenadante por decantación y se realizaron tres lavados con agua bidestilada nueva, aplicando en cada etapa de lavado 10 min de ultrasonido, reposo por 24h y decantación de las aguas madres. Se secó el sólido blanco obtenido en estufa (Venticell, España) a temperatura de 80°C.

*Síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita dopadas con iones Sr<sup>2+</sup>:* La síntesis de hidroxiapatita nanométrica sustituida con iones estroncio (Sr<sup>2+</sup>) se llevó a cabo por un procedimiento similar al de síntesis de la hidroxiapatita sin dopaje. Para ello se preparó una disolución de Na<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>).12H<sub>2</sub>O<sub>(ac)</sub> (p.a, Merck, Alemania) y otras dos soluciones cada una con una mezcla Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>/Sr(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (reactivos p.a, Merck, Alemania) con una concentración de un 10 % molar de iones Sr<sup>2+</sup> denominada: **nanoHA-10Sr**, o con un 20 % molar de iones de dopaje: **nanoHA-20Sr**. Estas disoluciones se hicieron reaccionar con la solución precursora de iones fosfato en una relación molar (Ca+Sr)/P de 1,67 empleando flujo de goteo de 0,5mL/min e intervalos de 10min de ultrasonido/descanso. Se supervisó que el pH final fuera mayor que 10. Se dejaron en reposo las suspensiones por 72h, se separaron las aguas madres por decantación, se repitió por tres veces el proceso de lavado con agua bidestilada, reposo 24h y decantación de aguas madres. Se secó el sólido blanco obtenido en estufa (Venticell, España) a temperatura de 80°C. Las ecuaciones de ambas reacciones químicas se detallan a continuación:

#### Síntesis **nanoHA-10Sr**:



#### Síntesis **nanoHA-20Sr**:



*Espectroscopia Infrarroja a Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR):* Una muestra de los polvos de cada reacción fue caracterizada directamente sin preparación previa mediante FTIR-ATR empleando un equipo Nicolet® (iS50-ATR, EEUU). Los registros se llevaron a cabo en el rango de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>.

*Difracción de Rayos-X (DRX):* A las muestras sintetizadas se les obtuvo su patrón de difracción de rayos-X en un difractómetro PANalytical® (Empyrean Nano, Reino Unido) utilizando para el procesamiento de la data el software X'Pert High Score® v2.01. Se utilizó como radiación de referencia Cu (Kα1), λ = 1,5406 Å operando a 30 mA y 40 kV. La data fue colectada en un rango de 2θ de 10-60° con paso de 0,02626° y un tiempo de acumulación de 20 s. Para la determinación del tamaño de cristalito ( $X_s$ ), se utilizó la ecuación de Debye-Scherrer (J. Lunz et al., 2015) tomando como referencia la reflexión (0 0 2) ubicada en 25,913° (2θ):

$$X_s = \frac{k\lambda}{FWHM \cos(\theta)}$$

Ec. 1

dónde:

$X_s$  es el tamaño de cristalito en nm,

$\lambda$  es la longitud de onda del haz de Rayos-X monocromático,

**FWHM** es la anchura a la altura media del pico de difracción bajo estudio,

$\theta$  es el ángulo de difracción

$k$  es la constante con valor de 0,9

Además se calcularon: el porcentaje o Fracción de cristalinidad ( $X_c$ ) (J. Lunz et al., 2015), los Parámetros de red  $a=b$  y  $c$  (Badran, Yahia, Hamdy, & Awwad, 2017) y el Volumen de la celda unidad ( $V$ ) (Badran et al., 2017) a través de las siguientes ecuaciones:

**Fracción de cristalinidad ( $X_c$ ):**

$$X_c = \left( \frac{0,24}{\beta} \right)^3 \quad \text{Ec.2}$$

dónde:  $\beta$  es **FWHM**

**Parámetros de red  $a=b$  y  $c$ :**

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left( \frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{1}{c^2} \quad \text{Ec.3}$$

dónde:

$d$  es la distancia entre dos planos adyacentes

$h$   $k$   $l$  son los índices de Miller correspondiente a los planos cristalográficos

**Volumen de la celda unidad ( $V$ ):**

$$V = \left( \frac{\sqrt{3}}{2} \right) a^2 c \quad \text{Ec.4}$$

dónde:

$a$  y  $c$  los parámetros de la celda unidad

*Espectroscopia fotoelectrónica de Rayos-X (XPS):* Los polvos obtenidos fueron caracterizados utilizando un equipo de XPS (Sepcs, Alemania) con detector Phoibos 150 y fuente monocromada de Al empleando una energía de excitación de 1486,71 eV y una energía cinética de 136,71 eV. El espectro fue procesado con el software Casa XPS® v2.3.19PR1.0. Se llevó a cabo el análisis en el rango de 0-1400 eV de energía de enlace.

*Distribución del tamaño de partícula:* Por el método de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) se analizó la distribución de tamaño de partículas con analizador Zetasizer nano-ZS90 (Malvern, Estados Unidos). Para ello las muestras fueron dispersadas en agua y ultrasonificadas (Fisherbrand FB11201, Reino Unido) durante 1 minuto empleando como dispersante trifosfato de sodio pentabásico (pureza  $\geq 98\%$ , Aldrich-Sigma, EEUU).

### Preparación y caracterización de biomateriales cerámicos porosos

*Preparación de biomateriales cerámicos porosos:* Se prepararon discos a partir de los polvos de nanoHA sintetizados y posteriormente fueron sinterizados de acuerdo con estudio previo (Fernandes Cóta et al., 2016; L. Morejón et al., 2021). Seis réplicas de cada muestra de aproximadamente 250 mg se prensaron en troquel cilíndrico de acero inoxidable con 8 mm de diámetro y bajo una presión uniaxial de 200 MPa por 1 minuto con prensa hidráulica (Specac Ltd, Reino Unido). Las muestras fueron sinterizadas a 900°C durante 6 horas en un horno mufla Termiber. España, utilizando una rampa de calentamiento de 2°C/min hasta la temperatura de sinterización.

*Caracterización de los biomateriales cerámicos porosos:* Se calculó el área de las muestras antes y después del proceso de sinterización empleando imágenes tomadas con un Microscopio Óptico Digital de Alta Definición (Uteruik, Estados Unidos). Se procesaron las microfotografías con el software ImageJ® v.1,39 y con las datas de áreas se calculó el porcentaje de **Contracción (%C)**. Además, se determinó la

**Densidad Aparente ( $\rho$ )** por el método geométrico a través de la expresión:  $\rho = \frac{m}{V}$ , donde la masa ( $m$ ) de las muestras se determinó con balanza analítica (Sartorius BL60(S), Alemania), el área ( $A$ ) a través de procesamiento digital de imágenes y la altura ( $h$ ) fue medida con pie de rey.

Se estimó también el porcentaje de **Porosidad Total (%P)** de las muestras mediante la expresión:



$$\%P = \frac{P(\text{teórica}) - P(\text{experimental})}{P(\text{teórica})} * 100$$

Ec.5

considerando que la densidad teórica de la hidroxiapatita es  $P(\text{teórica}) = 3,16 \text{ g/cm}^3$ .

Por medio de la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) (JEOL JSM 5410, Tokyo, Japan) se tomaron micrografías a 10 kV de la superficie de los discos previamente metalizados con pulverizador de oro (Agar Scientific AGB7340, Reino Unido). Las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ® (v.1,39) para medir las dimensiones de los granos y también las dimensiones de los poros. Para todas estas determinaciones se tomaron más de 400 medidas por muestra.

Se realizó análisis estadístico, con el auxilio del programa Statgraphics (Centurion XVI.I), para comparar las medias de **Contracción (%)**, **Densidad Aparente**, **Porosidad Total (%)**, **Tamaños de Granos** y

### Tamaño de los Poros.

*Evaluación de la bioactividad:* Se preparó una disolución de Fluido Fisiológico Simulado (SBF) tomando como referencia el protocolo para su preparación reportado por Kokubo (Kokubo & Takadama, 2006). Para ello se utilizó agua desionizada y se añadieron los reactivos grado analítico (Merck, Alemania): NaCl, KCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1M-HCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$  (ApliChem, Alemania) y  $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$  (Spectris, Reino Unido) en el orden y cantidad que se indican en el procedimiento, manteniendo constante la temperatura (36,5 °C) la agitación según lo indicado y con el ajuste de pH sugerido (7,26).

Réplicas de los discos de las tres muestras: **nanoHA**, **nanoHA-10Sr** y **nanoHA-20Sr** fueron colocadas en recipientes plásticos con 3 ml de SBF filtrado con filtro estéril de teflón de 0,22  $\mu\text{m}$  acoplado a jeringa estéril. Las muestras se mantuvieron en contacto con el SBF a 37°C por dos periodos de ensayo: 7 y 21 días. Una vez concluido el tiempo de ensayo las muestras fueron enjuagadas con agua bidestilada y alcohol y se dejaron secar a temperatura ambiente en desecadora hasta su visualización por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) (JEOL JSM 5410, Tokyo, Japan).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se evaluó la efectividad de la metodología de síntesis por vía húmeda acoplada a ultrasonido como técnica para la obtención de HA de dimensiones nanométricas dopada con iones  $\text{Sr}^{2+}$ . A la par, se evaluó la influencia de este ion en las características estructurales de las HA sintetizadas y también su efecto en la estructura de cerámicas porosas fabricadas a partir de las HA-Sr sinterizadas las cuales pudieran ser potencialmente empleadas como sustitutos del tejido óseo.

En particular, para las nanopartículas se determinó la influencia del ion  $\text{Sr}^{2+}$  sobre el tamaño de cristalito y de las partículas, la cristalinidad de las muestras y los parámetros de la celda cristalina; en el caso de las cerámicas, se estudió el efecto sobre propiedades como tamaño de los granos cerámicos, dimensiones de poros, porosidad total y bioactividad *in vitro* en Fluido Fisiológico Simulado.

### Caracterización de polvos de hidroxiapatita sin y con dopaje de iones de $\text{Sr}^{2+}$

Como resultado de los procedimientos experimentales llevados a cabo se obtuvo que en todas las síntesis se produjo la formación de un precipitado blanco muy fino que se mantenía en suspensión. El  $\text{pH}_{\text{final}}$  de todas las reacciones fue próximo a 11 hecho que propicia la formación de hidroxiapatita y no de otros compuestos fosfatocálcicos. En todas las síntesis se obtuvieron rendimientos elevados.

Los espectros FTIR de las muestras sintetizadas (Figura 1) indicaron la obtención de muestras con baja cristalinidad y las bandas detectadas se corresponden con las vibraciones características de los grupos presentes en la hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ . Se observó una banda ancha alrededor de  $3500 \text{ cm}^{-1}$  que corresponde con agua de humedad adsorbida, no obstante, para todas las muestras la ampliación de esta zona indica una señal aguda correspondiente a la vibración de estrechamiento del grupo OH en  $3566 \text{ cm}^{-1}$ , típica de la HA. Se aprecian además las bandas características del grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  a 1104-1006  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ ), 962  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_1$ ), 603-560  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ ), 470-460  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_2$ ) y las bandas correspondientes al grupo  $\text{CO}_3^{2-}$  en 1455, 1416  $\text{cm}^{-1}$  y 871  $\text{cm}^{-1}$  lo que indica una ligera carbonatación de las muestras por las condiciones de obtención. Se ha reportado (Avci, Yilmaz, Tezcaner, & Evis, 2017) que la inclusión de  $\text{Sr}^{2+}$  a la HA sintetizada por métodos biomiméticos resulta en una desaparición de las bandas FTIR del ion  $\text{CO}_3^{2-}$ , efecto que también puede ser observado en este trabajo por la disminución de las bandas a 1455, 1416  $\text{cm}^{-1}$  en comparación con las de la nanoHA, Figura 1a).

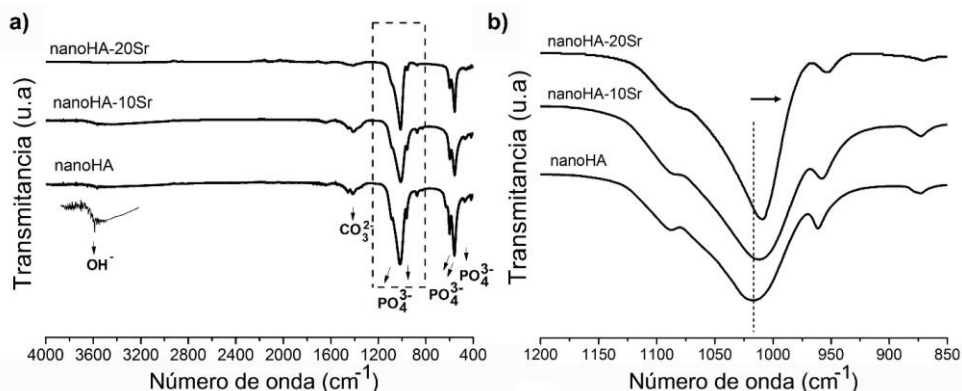


Fig. 1. Espectros FTIR-ATR de las hidroxiapatitas sintetizadas. a) Espectros de 4000-400cm<sup>-1</sup>; b) Espectros ampliados en la región de las vibraciones de valencia del grupo PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>

La Figura 1b) muestra de forma ampliada la región del espectro que corresponde con las vibraciones de valencia de los grupos PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> para lo cual se detecta que con el incremento del contenido de Sr<sup>2+</sup> se desplazan las bandas de absorción a corrimientos menores de la longitud de onda. Este efecto es indicativo de que ha ocurrido una modificación en el entorno químico local de los grupos fosfatos en las muestras de **nanoHA-Sr** por la incorporación de los iones estroncio a la estructura. El mayor radio iónico del estroncio en comparación con el del ion calcio puede influir en que aumenten las repulsiones anión-anión y las frecuencias de vibración de los grupos fosfatos se desplacen a menores energías como consecuencia de que disminuye la fortaleza del enlace P-O (El-Gohary et al., 2012). Estos cambios en las posiciones FTIR de las señales asociadas a los modos de vibración del grupo PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> por la presencia de Sr<sup>2+</sup> hacia menores valores de números de onda en comparación con la HA sin dopantes, han sido reportados también por otros autores (Avci et al., 2017; Edwin & Wilson, 2019; Ehret et al., 2017; Frasnelli et al., 2017). La Tabla 1 compara los valores obtenidos para nuestras muestras con otros reportes de la literatura.

Tabla 1. Longitudes de onda y asignaciones de las bandas FTIR-ATR para HA y con dopaje de iones Sr<sup>2+</sup>

REF.	Material	Método de Síntesis	Asignación						
			$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ (cm <sup>-1</sup> )	Efecto Sr <sup>2+</sup>	$\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ (cm <sup>-1</sup> )	Efecto Sr <sup>2+</sup>	$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ (cm <sup>-1</sup> )	Efecto Sr <sup>2+</sup>	
Presente trabajo	nanoHA		1017		961		600, 560		
	nanoHA-10Sr	Precipitación Química/US*	1012	↓	957	↓	598, 558	↓	
	nanoHA-20Sr		1010		953		598, 558	=	
(Ehret et al., 2017)	HA	Precipitación Química	1029		962		602, 563		
	HA-8Sr		1027	↓	961	↓	601, 562	↓	
	HA-50Sr		1023		956		598, 559		
(Frasnelli et al., 2017)	HA	Precipitación Química	1034		962		602, 565		
	HA-100Sr		1028	↓	947	↓	594, 561	↓	
	HA		1037		-		606, 568		
	HA-10Sr	Precipitación Química	1036		-		604, 567		
	HA-20Sr		1035	↓	-		604, 566	↓	
	HA-50Sr	+ 5 min US*	1031		-		600, 566		
	HA-100Sr		1022		-		597, 558		
	HA		1038		-		605, 567		
	(Edwin & Wilson, 2019)	HA-10Sr	Precipitación Química	1936		-		604, 567	
		HA-20Sr		1034	↓	-		603, 566	↓
HA-50Sr		+ 20 min US*	1029		-		601, 564		
HA-100Sr			1021		-		597, 561		
HA			1037		-		604, 567		
HA-10Sr		Precipitación Química	1037	=	-		604, 567	=	
HA-20Sr			1037	=	-		604, 564		
HA-50Sr		+ 60 min US*	1035	↓	-		598, 563	↓	
HA-100Sr		1022	↓	-		596, 558	↓		

Como se aprecia, las frecuencias de vibración que se detectan en este trabajo por FTIR para las HA-Sr son similares a los de otros estudios, aun cuando no se emplearan las mismas técnicas de síntesis. Estos resultados son indicativos, al menos de forma cualitativa, de la obtención de hidroxiapatitas sustituidas con estroncio. Se distingue también de los reportes que la aplicación excesiva de ultrasonido puede contrarrestar el efecto del corrimiento de las señales cuando se utilizan bajos contenidos de  $\text{Sr}^{2+}$  (Edwin & Wilson, 2019).

La Figura 2 muestra los patrones de difracción de las muestras sintetizadas. Se detecta coincidencia cercana con las reflexiones del patrón reportado para la hidroxiapatita pura (JCPDS n° 00-09-432) con un ensanchamiento de las señales lo que indica la obtención de muestras con baja cristalinidad directamente luego de la síntesis.

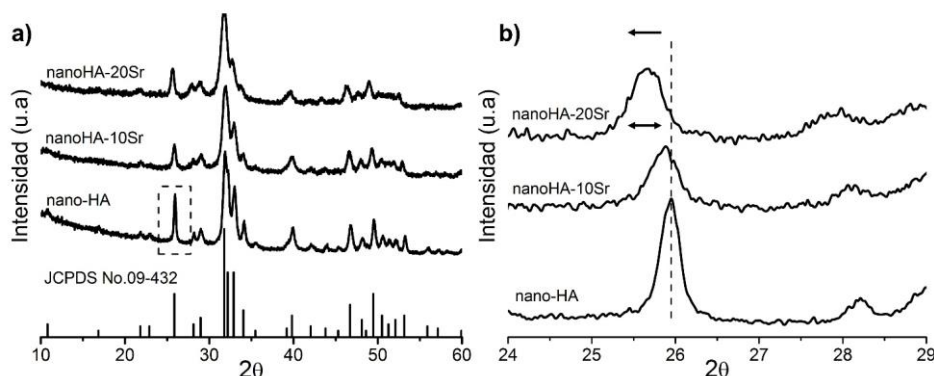


Fig. 2. a) Difractogramas de los polvos sintetizados: nanoHA, nanoHA-10Sr, nanoHA-20Sr y el patrón de la HA pura (JCPDS n° 09-432); b) Región ampliada de la reflexión (0 0 2) ubicada a  $25,913^\circ$  ( $2\theta$ )

Un análisis más detallado de la data DRX a través del software X'Pert High Score® v2.01 indicó la presencia del ion estroncio en la estructura de las sustancias dopadas por una mayor coincidencia con las fichas JCPDS n° 00-034-0484 correspondiente a  $\text{Ca}_9\text{Sr}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  y ficha JCPDS n° 00-034-0483 asociada a  $\text{Ca}_8\text{Sr}_2(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  para las muestras nanoHA-10Sr y nanoHA-20Sr respectivamente, lo que refleja la efectividad del procedimiento empleado en este trabajo para la síntesis de las HA sustituidas.

En la literatura Aina (Aina et al., 2013), reportó la síntesis de HA y HA sustituida con estroncio (20 y 40%) por el método de estado sólido, y comprobaron que existía correspondencia entre los patrones de difracción obtenidos de cada una de las muestras con los reportados en la base de datos ICDD; para la HA (JCPDS n° 09-432), la HA-20Sr (JCPDS n° 34-0483), y para la HA-40Sr (JCPDS n° 34-0480). Sin embargo, reportaron que para un 20% de sustitución de la HA con estroncio la fase mayoritaria presente correspondía a la apatita, pero que a un 40% del dopaje, existía la presencia de otra fase fosfatocálcica: el  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP), además de la fase de hidroxiapatita.

Este efecto también ha sido reportado por otros autores (Abert, Bergmann, & Fischer, 2014), los que evaluaron la incorporación de  $\text{Sr}^{2+}$  en un 0, 5, 10, 15, 18, 26 y 34% detectando que a bajos porcentos de sustitución se obtenía apatita como fase mayoritaria pero que a altas concentraciones de iones estroncio (18, 26 y 34%), ocurría una desestabilización de la estructura de la HA y se favorecía la formación de  $\beta$ -TCP como fase secundaria. No obstante, Kaygili sintetizó HA-Sr utilizando solo pocas cantidades de sustituyente (0; 0,45; 0,90; 1,35 y 2,25%) mediante el método de Sol-Gel y detectó en todos los difractogramas la presencia combinada de hidroxiapatita y  $\beta$ -fosfato tricálcico (contenido de  $\beta$ -TCP entre 1,35 y 4,65%), lo que sugiere que no sólo influye la concentración del sustituyente en la pureza de la fase final, sino también la metodología y las condiciones de síntesis (Kaygili et al., 2015). En nuestro trabajo no hubo indicio de formación de otras fases fosfatocálcicas.

La Figura 2b) muestra de forma ampliada la reflexión (0 0 2) ubicada a  $25,913^\circ$  ( $2\theta$ ) en la que se observa claramente que con la incorporación del ion dopante se produce un desplazamiento de las señales a menores valores de  $2\theta$  y un ensanchamiento de las reflexiones indicio de una menor cristalinidad en las muestras con sustituyente.

La Tabla 2 resume los valores calculados de **Tamaño de cristalito** ( $X_s$ ), **Fracción de cristalinidad** ( $X_c$ ), **Parámetros de la red** y **Volumen de la celda unidad** de los polvos sintetizados de conjunto con los valores de muestras patrones de la cartoteca y reportes de la literatura. Para todas las muestras experimentales de este trabajo se detecta que las dimensiones son nanométricas ( $X_s < 54\text{nm}$ ), además, se evidencia que con el incremento del contenido de  $\text{Sr}^{2+}$  en las muestras sintetizadas las posiciones de las reflexiones aparecen a menores valores como ocurre en los patrones de difracción para HA sustituidas de la cartoteca (Tabla 2) y en correspondencia con los hallazgos unánimes de otros autores (Ehret et al., 2017; Frasnelli et al., 2017) hecho que evidencia la incorporación del  $\text{Sr}^{2+}$  a la estructura de la HA en las condiciones de síntesis empleadas.

Asimismo, se observa que la presencia del  $\text{Sr}^{2+}$  afecta sensiblemente las propiedades estructurales de la nanoHA ya que disminuye tanto el **Tamaño de cristalito** ( $X_s$ ) (desde  $\sim 50\text{nm}$  a  $\sim 30\text{nm}$ ) como la **Fracción de cristalinidad** ( $X_c$ ) casi en un 80% (desde 74,3% a 12,5%). Además, se detectó que la incorporación del  $\text{Sr}^{2+}$  al cristal de la HA modifica los parámetros estructurales de la red, disminuyendo las dimensiones de  $a$  mientras que se aprecia un aumento preferencial en el parámetro de la red  $c$ , lo que produce un incremento global del **Volumen de la celda unidad** desde  $527,7$  a  $531,1$  ( $10^6 \text{pm}^3$ ).

Tabla 2. Valores de Tamaño de cristalito ( $X_s$ ), Fracción de cristalinidad ( $X_c$ ), Parámetros de la red y Volumen de la celda unidad de los polvos obtenidos.

REF.	Material	$2\theta$	Efecto Sr <sup>2+</sup>	$X_s$ (nm)	Efecto Sr <sup>2+</sup>	$X_c$ (%)	Efecto Sr <sup>2+</sup>	Parámetros de la celda					
								$a$ (Å)	Efecto Sr <sup>2+</sup>	$c$ (Å)	Efecto Sr <sup>2+</sup>	V (10 <sup>6</sup> pm <sup>3</sup> )	Efecto Sr <sup>2+</sup>
Patrones	HA (JCPDS n° 09-432)	25,879		-		-		9,4180		6,8840		528,80	
Cartoteca	Ca <sub>9</sub> Sr(PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub> (JCPDS n° 00-034-0484)	25,727	↓	-		-		9,4600	↑	6,9200	↑	536,31	↑
	Ca <sub>8</sub> Sr <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub> (JCPDS n° 00-034-0483)	25,577		-		-		9,4860		6,9510		541,68	
	Material	Método de Obtención											
Presente trabajo	nanoHA	25,913		53,69		74,3		9,423		6,871		527,7	
	nanoHA-10Sr	25,838	↓	38,45	↓	27,3	↓	9,417	↓	6,891	↑	528,6	↑
	nanoHA-20Sr	25,635		29,62		12,5		9,403		6,944		531,1	
(Aina et al., 2013)	HA	25,93		81,7		93		9,413		6,879		527,9	
	HA-20Sr	25,57	↓	62,9	↓	87	↓	9,486	↑	6,959	↑	542,3	↑
	HA-40Sr	25,23		35,4		84		9,546		7,029		554,7	
(Frasnelli et al., 2017)	HA	25,87		52		-		9,423		6,881		529,1	
	HA-5Sr	25,81		31		-		9,435		6,899		531,9	
	HA-10Sr	25,63	↓	19	↑↑	-	-	9,461	↑	6,921	↑	536,5	↑
	HA-25Sr	25,57		30		-	-	9,507		6,974		545,9	
	HA-50Sr	25,18		25		-	-	9,609		7,087		566,7	
	HA-75Sr	24,82		19		-	-	9,668		7,166		580,1	
	HA-100Sr	24,40		41		-	-	9,776		7,289		603,3	
(Xu et al., 2018)	HA	-	-	-	-	93,77		9,432		6,880		530,0	
	HA-1Sr	-	-	-	-	92,17		9,433		6,881		530,2	
	HA-3Sr	-	-	-	-	91,94		9,434		6,887		530,8	
	HA-5Sr	-	-	-	-	91,91		9,436		6,888		531,1	
	HA-7Sr	-	-	-	-	90,23		9,440	↑	6,893	↑	531,9	↑
	HA-9Sr	-	-	-	-	92,07	↓↓	9,450		6,895		533,2	
	HA-10Sr	-	-	-	-	91,45		9,451		6,896		533,3	
	HA-15Sr	-	-	-	-	90,94		9,458		6,901		534,6	
	HA-20Sr	-	-	-	-	90,45		9,469		6,922		537,5	
	HA	-	-	26,80		87		9,381		6,849		522,0	
(Kaygili et al., 2015)	HA-0,45Sr	-	-	23,02		76		9,408		6,885		527,8	
	HA-0,90Sr	-	-	26,68	↑↑	78	↑↑	9,404	↑↑	6,880	↑↑	526,9	↑↑
	HA-1,35Sr	-	-	23,24		80		9,408		6,870		526,6	
	HA-1,80Sr	-	-	21,40		75		9,413		6,875		527,7	
	HA-2,25Sr	-	-	20,91		69		9,395		6,875		525,5	



El incremento del **Volumen de la celda unidad** está en correspondencia con el mayor radio iónico del  $\text{Sr}^{2+}$  (1,13 Å) en comparación con el del  $\text{Ca}^{2+}$  (0,99 Å). Todas esas variaciones de parámetros sin dudas podrían tener influencia en el proceso posterior de sinterización para el conformado de piezas cerámicas con vistas a ser usadas como biomateriales implantables en el tejido óseo. Influencia que podría ser en principio a consecuencia de: la disminución de la cristalinidad, las menores dimensiones de los cristales por la presencia del sustituyente (ya de por sí nanométricas) y por ende de la mayor área superficial de esas partículas, así como por la presencia del ion  $\text{Sr}^{2+}$  en la red cristalina.

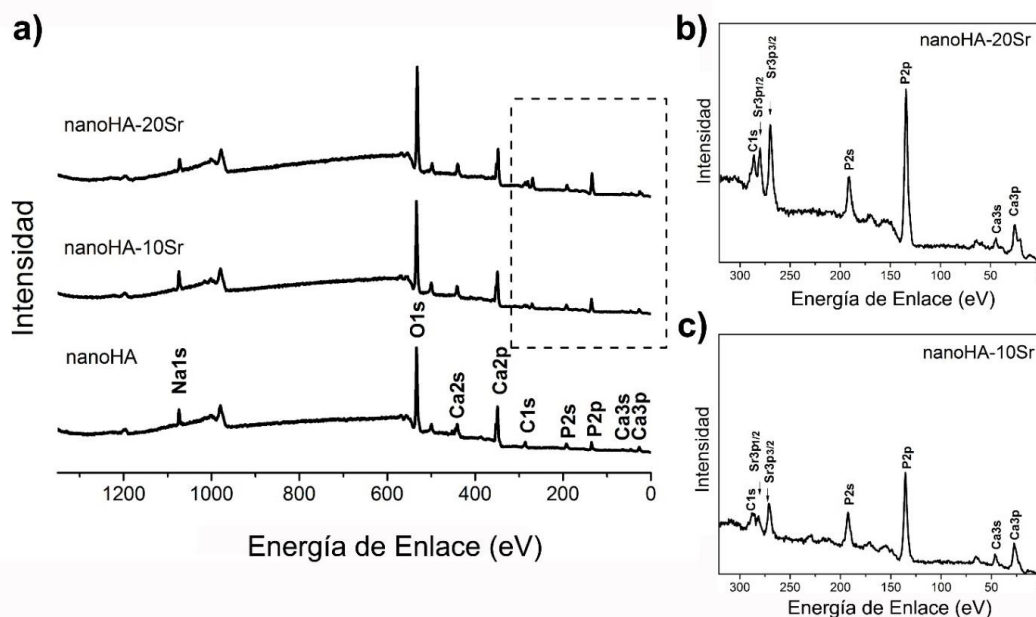
El análisis de la Tabla 2 nos indica que la incorporación del  $\text{Sr}^{2+}$  incide generalmente en una disminución del **Tamaño de cristalito** ( $X_s$ ) y de la **Fracción de cristalinidad** ( $X_c$ ). El empleo de ultrasonido durante la síntesis en este trabajo puede ser la causa de la disminución tan abrupta de la **Fracción de cristalinidad** ( $X_c$ ) (disminución de ~80%) dado que otras metodologías no conducen a resultados tan marcados. Así, el dopaje de la HA con este elemento y el empleo de ultrasonido en la síntesis producen un efecto sinergia que conduce a partículas de dimensiones nanométricas menores y de muy baja cristalinidad. Este efecto puede ser aprovechado para la síntesis de HA-Sr que serán usadas directamente como carga inorgánica en la preparación de composites poliméricos o también de cementos fosfatocálcicos para aplicaciones médicas, dado que sus dimensiones nano y su baja cristalinidad pueden favorecer un rápido intercambio con el entorno fisiológico para acelerar procesos biológicos.

En cuanto a los parámetros de la red se reporta en la literatura generalmente que los ejes  $a$  y  $c$  de la celda incrementan ambos sus dimensiones con la incorporación del sustituyente de mayor radio atómico y provocan una distorsión de la celda cristalina que conlleva a un incremento final del **Volumen de la celda unidad**. Se discute que el ion  $\text{Sr}^{2+}$  al ser un ion divalente (al igual que el ion  $\text{Ca}^{2+}$ ), al introducirse en la red cristalina de la HA puede ocupar las posiciones características de los iones Ca (I) y Ca(II) o puede producirse una sustitución mixta (B. Kumar, Jagannatham, Venkateswarlu, Dumpala, & Sunil, 2021), pero hoy día aún existe controversia sobre qué incide en que se ocupe preferencialmente una u otra posición y sea en una u otra posición así será la variación de los parámetros de la red.

No obstante, en este debate también es de destacar que el uso del ultrasonido juega un papel fundamental en las dimensiones de la celda unidad. En el estudio de Edwin de síntesis de HA-Sr por precipitación vía húmeda, ultrasonido y calcinación de las muestras a 600 °C/2 h evaluaron tanto el dopaje con  $\text{Sr}^{2+}$  como el efecto de la aplicación de ultrasonido por diferentes periodos de tiempo (Edwin & Wilson, 2019). Para este estudio se obtuvo que en dependencia del tiempo de ultrasonido los parámetros de la red  $a$  y  $c$  pueden aumentar o decrecer, por ejemplo comparando los parámetros de la red con los de la apatita obtenida en la condición previa : HA pura 0min US ( $a=9,389$  y  $c=6,838$ ); 5min US ( $a=9,369\downarrow$  y  $c=6,805\downarrow$ ); 10min US ( $a=9,382\uparrow$  y  $c=6,815\uparrow$ ); 20 min US ( $a=9,345\downarrow$  y  $c=6,817\uparrow$ ); 60min US ( $a=9,355\uparrow$  y  $c=6,826\uparrow$ ) mientras que para HA-20Sr 0min US ( $a=9,447$  y  $c=6,927$ ); 5min US ( $a=9,416\downarrow$  y  $c=6,848\downarrow$ ); 10min US ( $a=9,453\uparrow$  y  $c=6,866\uparrow$ ); 20 min US ( $a=9,416\downarrow$  y  $c=6,841\downarrow$ ); 60min US ( $a=9,442\uparrow$  y  $c=6,679\downarrow$ ).

Las variaciones detectadas en este trabajo en las propiedades de **Tamaño de cristalito** ( $X_s$ ), **Fracción de cristalinidad** ( $X_c$ ), **Parámetros de la red** y **Volumen de la celda unidad** en comparación con los valores obtenidos para la HA sin dopaje constituyen una clara evidencia de la efectividad de la incorporación del  $\text{Sr}^{2+}$  en la estructura por la metodología empleada.

Por su parte, la Figura 3 muestra los espectros de la caracterización a través de la Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos-X (XPS) en donde se detectan los elementos atómicos de la HA, acordes con las energías de enlace características de los orbitales: Ca (2s, 2p, 3s y 3p), O (1s) y P (2s y 2p). Mientras que para las HA sustituidas (Figura 3b y Figura 3c) aparecen además las señales correspondientes al Sr (3p) lo que confirma también la inclusión del ion en la red y no una simple adsorción del elemento.



**Fig. 3.** a) Espectros XPS de los polvos sintetizados: *nanoHA*, *nanoHA-10Sr*, *nanoHA-20Sr*; b) y c) Ampliación de la zona del espectro de las muestras sustituidas para la apreciación de las señales del Sr.

La Tabla 3, detalla las energías de enlace características de cada elemento químico presente en las hidroxiapatitas sintetizadas. Reportes de la literatura para la HA-Sr incluyen señales XPS: Ca<sub>2p<sub>3/2</sub></sub> (347,5 eV), O 1s (531,5 eV), P<sub>2p<sub>3/2</sub></sub>/Sr<sub>3d<sub>5/2</sub></sub> (133,5 eV), Sr<sub>3p<sub>3/2</sub></sub> (269,5 eV), además de la señal de C 1s (285,0 eV). La señal ubicada a 133,5 eV se corresponde a la unión de Sr<sub>3d</sub> y P<sub>2p</sub> porque Sr<sub>3d<sub>5/2</sub></sub> (133 ± 0,5 eV), Sr<sub>3d<sub>3/2</sub></sub> (135 ± 0,5 eV) y las líneas de P<sub>2p</sub> (132–133 eV) están ubicadas muy cerca una de otra (Robinson, Salma-Ancane, Stipniece, Meenan, & Boyd, 2017).

**Tabla 3.** Energías de enlace (eV) detectadas por XPS de las muestras *nanoHA*, *nanoHA-10Sr* y *nanoHA-20Sr*.

Señal	(Lide, 2005)	<i>nanoHA</i>	<i>nanoHA-10Sr</i>	<i>nanoHA-20Sr</i>
O 1s	531,6	533,5	533,5	532,0
Ca 2p	349,7	349,5	349,5	348,0
P 2p	136,0	135,5	135,5	134,5
Sr 3p 3/2	270,0	-	271,5	269,5

Con relación al análisis de las partículas por Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) se determinó la distribución de tamaños hidrodinámicos de los polvos sintetizados (Figura 4). Los valores detectados se corresponden con las dimensiones de los aglomerados más estables de las partículas, dado que éstas se aglutinan en suspensión a consecuencia de su elevada área y carga superficial a pesar de haber empleado polifosfato como dispersante. No obstante, los tamaños promedio de los aglomerados son nanométricos y van desde 150 a 270 nm, aunque no se detecta una tendencia clara con la incorporación del Sr<sup>2+</sup> en el valor promedio de tamaños. Sin embargo, sí se detecta que hay influencia en la dispersión de los tamaños de partículas ya que para las dos HA substituidas se obtienen distribuciones de tamaños significativamente más estrechas en relación con la HA sin dopante.

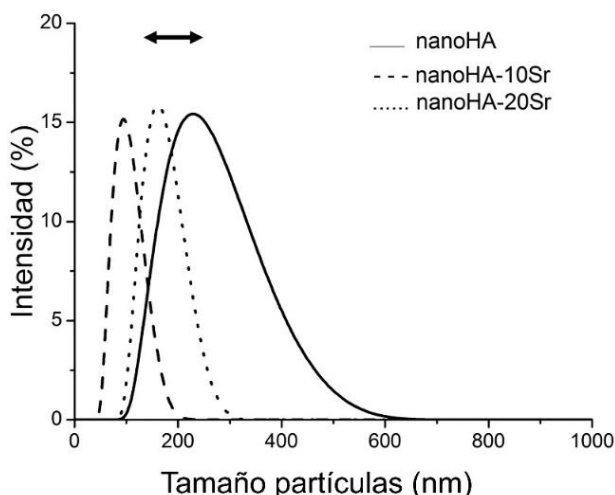


Fig. 4. Distribución del tamaño hidrodinámico de partículas de las HA sintetizadas —HA; --- HA-10Sr; ....HA-20Sr

En la literatura, Frasnelli reporta que las dimensiones obtenidas por DLS en HA con sustituciones de 0-100% de  $\text{Sr}^{2+}$  van desde 98 a 228 nm, mientras que, las determinaciones por SEM de las longitudes de los nanocilindros que obtuvieron, eran entre un 45-55% de tamaño menor, desde 45 a 125 nm (Frasnelli et al., 2017). Enrhet a su vez reporta la formación de agregados mucho mayores, sus determinaciones por DLS resultan para HA ( $3,26 \pm 0,62 \mu\text{m}$ ); HA-8Sr ( $4,15 \pm 0,83 \mu\text{m}$ ) y HA-50Sr ( $4,35 \pm 0,85 \mu\text{m}$ ) (Ehret et al., 2017).

Según reporta Edwin el ultrasonido modifica tanto la morfología como el tamaño de las partículas (Edwin & Wilson, 2019). A partir de los núcleos primarios, el ultrasonido inicialmente favorece el crecimiento de los cristales por el mecanismo de autoensamblaje de nanopartículas adyacentes compartiendo un plano cristalográfico común para disminuir la energía superficial (crecimiento preferencial en el eje c) (Edwin & Wilson, 2019). Esto incrementa sustancialmente la relación de aspecto (se obtienen nanocilindros) pero a mayor tiempo de ultrasonido la cavitación ultrasónica induce la ruptura de las partículas y disminuye la relación de aspecto. Por lo que el tiempo de ultrasonido puede incidir lo mismo en un aumento del tamaño de partículas como en un decrecimiento de las dimensiones. Según sus resultados, la fragmentación en las HA dopadas con  $\text{Sr}^{2+}$  es proporcional a la cantidad del dopante en la muestra. Estudios previos también han evidenciado que no sólo influye el tiempo de aplicación de ultrasonido en la morfología y cristalinidad de las partículas, sino también la amplitud de la señal ultrasónica (J. Lunz et al., 2014).

Hasta aquí, puede señalarse que la técnica de síntesis de precipitación por vía húmeda utilizada para la obtención de apatitas sustituidas con  $\text{Sr}^{2+}$  fue efectiva para la inclusión del agente dopante en la estructura del cristal; que la presencia del  $\text{Sr}^{2+}$  modificó las posiciones de las bandas de vibración FTIR y las posiciones de las señales DRX debido a cambios en el entorno de los elementos y grupos funcionales de la HA. Además, que el  $\text{Sr}^{2+}$  disminuyó el tamaño de cristalito y la cristalinidad en las muestras, y por demás, que el empleo de ultrasonido contribuyó a la obtención de HA aún más nanométricas y con muy baja cristalinidad. También, que se incrementó el **Volumen de la celda unidad** por la presencia del dopante de mayor radio iónico, y que se consiguieron partículas con distribuciones de tamaños más homogéneas.

#### Caracterización de implantes cerámicos porosos de hidroxiapatita sin y con dopaje de iones de $\text{Sr}^{2+}$

La Figura 5 muestra las imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de discos de nanoHA pura y con  $\text{Sr}^{2+}$  como sustituyente (10 y 20%). En todos los casos es posible distinguir los granos cerámicos, la formación de cuellos de unión entre éstos y que a la temperatura empleada para la sinterización ( $900^\circ\text{C}$ ) aún no existe una coalescencia total de los granos cerámicos por lo que quedan espacios entre ellos y se obtienen estructuras porosas. Se observa, además, que tanto los granos cerámicos como las cavidades entre ellos (poros) son de dimensiones heterogéneas, que las piezas cerámicas aparentan una estructura más compacta con el incremento del contenido de  $\text{Sr}^{2+}$ , pero que conservan aún microporosidad que parece estar interconectada.

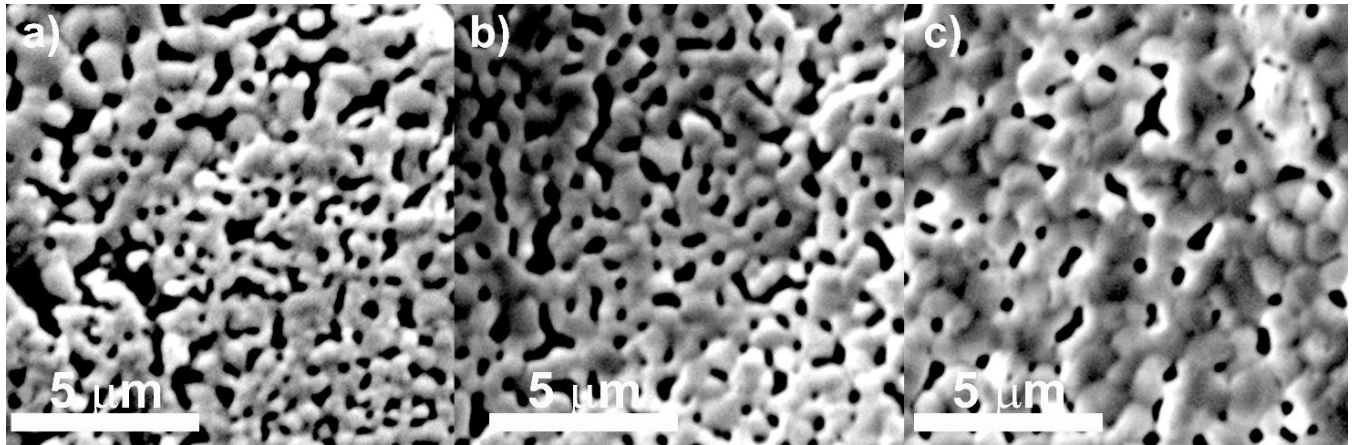


Fig. 5. Micrografías SEM de las cerámicas de: a) nanoHA; b) nanoHA-10Sr y c) nanoHA-20Sr

La Tabla 4 resume los valores calculados para distintas propiedades de las cerámicas obtenidas a partir de las nanoHA, nanoHA-10Sr y nanoHA-20Sr sintetizadas.

Con relación a los **Tamaños de Granos** resultan nanométricos o submicrométricos, con dimensiones que son más pequeñas que el de las cerámicas convencionales por lo cual las cerámicas obtenidas exponen mayor área de contacto al medio biológico que sus análogas micrométricas. El **Tamaño de Grano** aumenta con la incorporación del Sr<sup>2+</sup> detectándose diferencias estadísticas significativas entre muestras con un nivel del 95,0% de confianza. Las dimensiones de los granos varían desde nanómetros a micras en el siguiente orden: nanoHA (150-1640 nm) < nanoHA-10Sr (250-1720 nm) < nanoHA-20Sr (400-1940 nm). El hecho que se detecten estas diferencias sustanciales sugiere que el Sr<sup>2+</sup> posee efecto sobre la temperatura de inicio de la sinterización, la cual debe ser menor a mayor contenido del ion dopante y por ello las piezas cerámicas resultan con mayor coalescencia entre granos a iguales tratamientos térmicos.

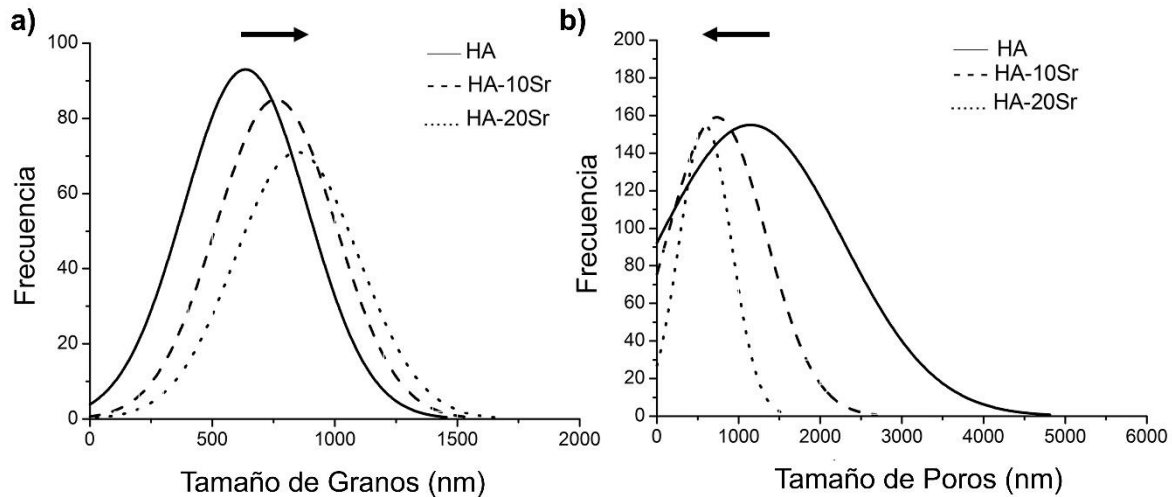
Tabla 4. Densidad Aparente, Porosidad Total (%) y Contracción (%) de las cerámicas de nanoHA y nanoHA-Sr (10, 20%) al ser sinterizadas a 900°C.

	nanoHA	nanoHA-10Sr	nanoHA-20Sr
Tamaño de Granos (nm)	635 ± 252	760 ± 244	846 ± 252
Tamaño de Poros (nm)	1148 ± 1000	723 ± 592	593 ± 317
Densidad Aparente* (g/cm <sup>3</sup> )	1,28 ± 0,09	1,33 ± 0,09	1,66 ± 0,11
Porosidad Total* (%)	59,5 ± 2,9	57,8 ± 2,9	47,5 ± 3,4
Contracción* (%)	2,5 ± 0,2	18,4 ± 0,8	21,3 ± 1,6

\*( $\bar{X} \pm SD$ )  $\bar{X}$  (media) SD (desviación estándar, de sus siglas en inglés)

La Figura 6a) muestra las distribuciones de **Tamaños de Grano** obtenidas a partir de los histogramas en donde se puede apreciar que se incrementa el tamaño medio con la incorporación del sustituyente, sin embargo, no hay un efecto marcado en la amplitud de las distribuciones.





**Fig. 6.** a) Distribución del **Tamaño de Granos** de las cerámicas obtenidas a partir de las HA sintetizadas; b) Distribución del **Tamaño de Poros** de las cerámicas obtenidas a partir de las HA sintetizadas. —HA; - - - HA-10Sr; ····HA-20Sr

Por su parte, el **Tamaño de los Poros** disminuye sustancialmente por la presencia del sustituyente con diferencias estadísticas significativas entre muestras con un nivel del 95,0% de confianza. Las muestras cerámicas a partir de **nanoHA** (Figura 5a) poseen desde cavidades irregulares con pequeños poros entre granos, hasta espacios libres de mayores dimensiones por los que se pueden propagar grietas, lo que sugiere, muestras con bajas propiedades mecánicas. En contraposición las muestras de **nanoHA-20Sr** poseen cavidades con menor tamaño medio (~600nm) y una distribución de **Tamaños de Poros** significativamente más estrecha que las de las cerámicas de **nanoHA-10Sr** y **nanoHA** (Figura 6b).

Con relación a la **Densidad Aparente** esta se incrementa al dopar la **nanoHA** con una mayor cantidad de iones estroncio, ello es debido al mayor peso atómico de este elemento químico en relación con el  $\text{Ca}^{2+}$  y también a las diferencias de contracción de las piezas en el proceso de sinterización. No obstante, todos los valores de **Densidad Aparente** resultan menores que la densidad teórica de la hidroxiapatita ( $3,16 \text{ g/cm}^3$ ). El análisis estadístico reveló que, debido a la dispersión de valores, no existen diferencias significativas entre las muestras **nanoHA** y **nanoHA-10Sr**, pero la muestra **nanoHA-20Sr** sí posee una **Densidad Aparente** significativamente mayor.

La **Porosidad Total** (%) osciló entre un 50-60%, lo que es positivo para lograr una mayor interacción con el tejido huésped y si bien las dimensiones de poros no alcanzan dimensiones macrométricas para la colonización celular, estas cerámicas tendrán una mayor área superficial para la interacción implante-célula, se favorecerá la adsorción de proteínas y la irrigación sanguínea por fuerzas de capilaridad, a la vez que permitirán el paso de fluidos e intercambio de nutrientes/desechos con el medio y podrán tener mejores propiedades para aplicaciones con mayores exigencias mecánicas. No obstante, el análisis estadístico indicó que no existen diferencias estadísticas entre las muestras **nanoHA** y **nanoHA-10Sr**, pero la muestra **nanoHA-20Sr** posee una porosidad significativamente menor.

En cuanto a los cambios dimensionales, las muestras sin dopar presentaron bajos valores de **Contracción**, apenas  $2,5 \pm 0,2\%$ . Sin embargo, las muestras con  $\text{Sr}^{2+}$  presentaron valores de contracción de ~20%. El análisis estadístico indicó que existen diferencias estadísticas entre todas las parejas de muestras, o sea: **nanoHA/nanoHA-10Sr**, **nanoHA/nanoHA-20Sr** y **nanoHA-10Sr/nanoHA-20Sr**. Este efecto puede deberse a que el ion dopante afecta las propiedades de los polvos de partida: menor **Tamaño de cristalito** y menor **Fración de cristalinidad**, lo que implica que las muestras al estar constituidas por partículas más pequeñas y más amorfas poseen mayor área superficial, y por tanto, puede existir mayor interacción entre las partículas durante el proceso de sinterización lo que da lugar a mayor **Contracción/Densificación** y por tanto menor **Porosidad** final, sin descartar que a la vez exista un efecto del ion  $\text{Sr}^{2+}$  en la temperatura de inicio de la sinterización.

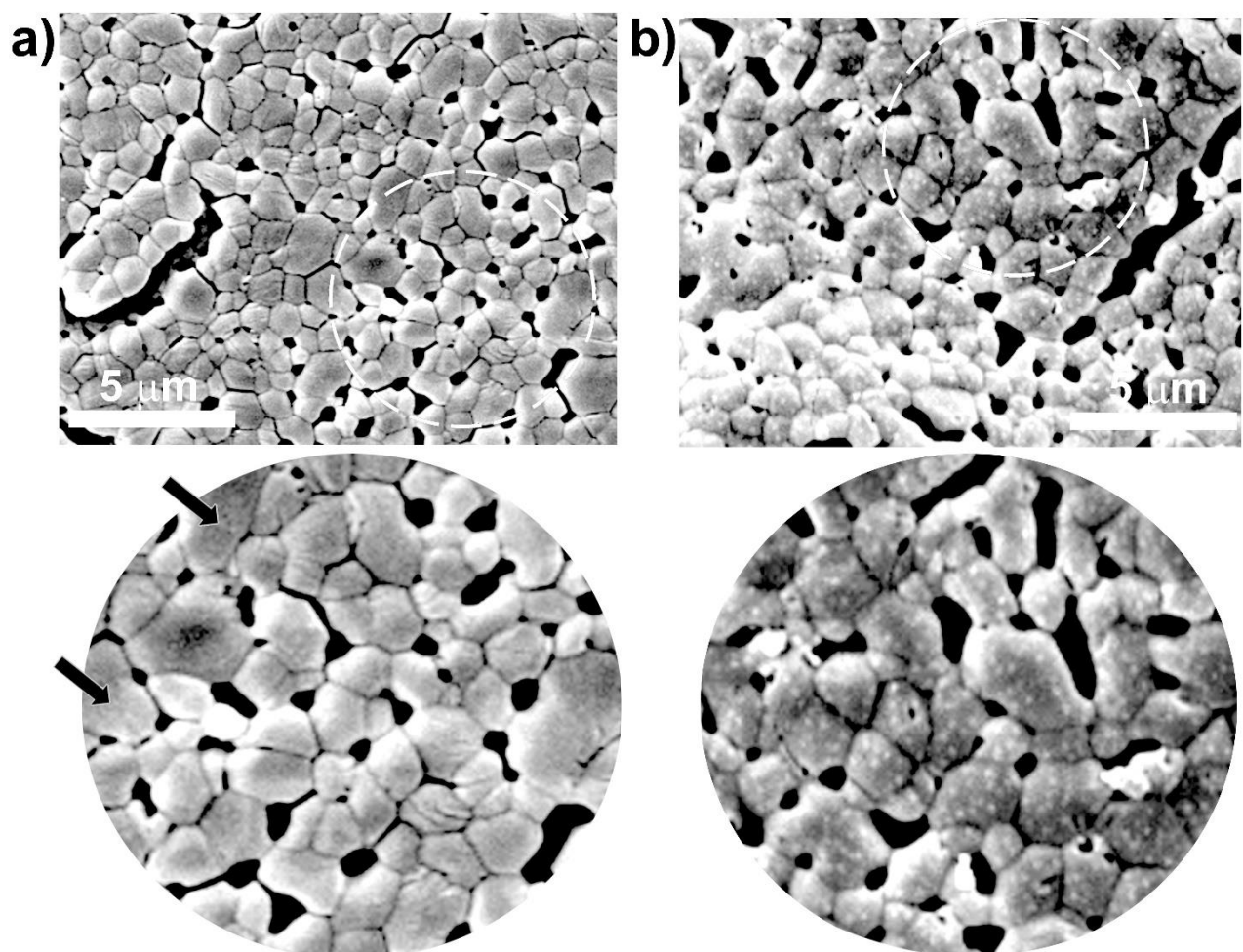
Finalmente, los estudios llevados a cabo de bioactividad *in vitro* por inmersión en Fluido Fisiológico Simulado refrendan que cerámicas obtenidas a partir de **nanoHA** dopada con  $\text{Sr}^{2+}$  aceleran los procesos de bioactividad como se observa en la Figura 7b), en donde se aprecia que a 21 días hay diferencias marcadas en comparación con las cerámicas sin dopar, Figura 7a) dado que se detecta la presencia de núcleos de depósitos fosfatocálcicos sobre los granos cerámicos, lo que no ocurre de forma clara aún con



las cerámicas sin dopar al mismo periodo de inmersión. Las flechas en la Figura 7a) indican sólo la somera presencia de núcleos amorfos de un depósito superficial en los granos cerámicos.

De acuerdo a reportes de la literatura (Kaygili et al., 2015), muestras de HA dopadas con Sr<sup>2+</sup> sumergidas en una solución de SBF durante 28 días presentan una mejor relación molar en la capa depositada superficialmente (Ca+Sr)/P (1,53 vs. 1,60) a medida que se incrementa el contenido del sustituyente (de 0,45% a 2,25% de Sr<sup>2+</sup>). Mahabole, por su parte reportó cambios morfológicos superficiales luego de la inmersión en SBF<sub>modificado</sub> de piezas de HA-Sr obtenidas por intercambio iónico a partir de HA pura y posterior tratamiento térmico a 500 °C/2h (Mahabole, Bahir, Kalyankar, & Khairnar, 2012). Específicamente detectaron que a 8 días de incubación en SBF<sub>modificado</sub> había nucleación de abundantes partículas diminutas de apatita granular mientras que a los 16 días la superficie se encontraba totalmente cubierta de una capa de agregados de apatita y que generalmente con el tiempo de inmersión mejoraba esa tasa de nucleación de apatita lo que atribuyeron a que la HA-Sr actúa como plantilla para el crecimiento superficial de apatita y evidencia su naturaleza bioactiva.

Los resultados de nuestro trabajo confirman estos estudios previos y que la incorporación de este agente dopante incrementa la bioactividad de las cerámicas.



**Fig. 7.** Micrografías SEM de las cerámicas luego de la inmersión por 21 días en SBF.  
a) nanoHA; b) nanoHA-20Sr

## CONCLUSIONES

En este trabajo se verificó la efectividad de la síntesis por vía húmeda de hidroxiapatitas sustituidas con Sr<sup>2+</sup> (10, 20%) y la utilidad de la aplicación de ultrasonido para disminuir aún más el tamaño de cristalito, la cristalinidad y el tamaño de partículas. Los resultados obtenidos con relación a las variaciones de los parámetros de red estuvieron en concordancia con otros reportes previos. La inclusión del estroncio como ion dopante en la hidroxiapatita modifica significativamente propiedades como la contracción y la porosidad total resultante de cerámicas microporosas, así como, el tamaño de granos y el tamaño de poros, lo que tendrá influencia en las propiedades mecánicas y por tanto en las aplicaciones biomédicas finales. Se demostró además que la presencia de estroncio incide en una mayor bioactividad de las cerámicas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración y apoyo en las tareas de caracterización de diferentes investigadores e instituciones, entre ellos: Universidad de Guadalajara (Jalisco, México) y Universidad Internacional de Catalunya (Barcelona, España). Parte de los resultados presentados en la presente publicación recibió fondos de la Oficina de Gestión de Fondos y Proyectos Internacionales del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, Cuba; bajo el código **PN211LH008-034**.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abert, J., Bergmann, C., & Fischer, H. (2014). Wet chemical synthesis of strontium-substituted hydroxyapatite and its influence on the mechanical and biological properties. *Ceramics International*, 40(7), 9195-9203. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884214001655>
- Aina, V., Bergandi, L., Lusvardi, G., Malavasi, G., Imrie, F.E., Gibson, I.R., . . . Ghigo, D. (2013). Sr-containing hydroxyapatite: morphologies of HA crystals and bioactivity on osteoblast cells. *Materials Science and Engineering: C*, 33(3), 1132-1142. doi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493112005620>
- Avci, M., Yilmaz, B., Tezcaner, A., & Evis, Z. (2017). Strontium doped hydroxyapatite biomimetic coatings on Ti6Al4V plates. *Ceramics International*, 43(12), 9431-9436. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884217307241>
- Badran, H, Yahia, IS, Hamdy, Mohamed S, & Awwad, NS. (2017). Lithium-doped hydroxyapatite nano-composites: synthesis, characterization, gamma attenuation coefficient and dielectric properties. *Radiation Physics and Chemistry*, 130, 85-91. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0969806X16302511>
- Baier, M., Staudt, P., Klein, R., Sommer, U., Wenz, R., Grafe, I., . . . Kasperk, C. (2013). Strontium enhances osseointegration of calcium phosphate cement: a histomorphometric pilot study in ovariectomized rats. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 8(1), 1-8. <https://link.springer.com/article/10.1186/1749-799X-8-16>
- Bonnelye, E., Chabadel, A., Saltel, F., & Jurdic, P. (2008). Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone*, 42(1), 129-138. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S8756328207006667>
- Dorozhkin, S.V. (2008). Calcium orthophosphate cements for biomedical application. *Journal of Materials Science*, 43(9), 3028-3057. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10853-008-2527-z>
- Dorozhkin, S.V. (2013). Calcium orthophosphate-based bioceramics. *Materials*, 6(9), 3840-3942. <https://www.mdpi.com/1996-1944/6/9/3840>
- Dorozhkin, S.V. (2018). Current state of bioceramics. *J. Ceram. Sci. Technol*, 9(4), 353-370.
- Du, M., Chen, J., Liu, K., Xing, H., & Song, C. (2021). Recent advances in biomedical engineering of nano-hydroxyapatite including dentistry, cancer treatment and bone repair. *Composites Part B: Engineering*, 215, 108790. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359836821001827>
- Edwin, N., & Wilson, P. (2019). Investigations on sonofragmentation of hydroxyapatite crystals as a function of strontium incorporation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 50, 188-199. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1350417718303572>
- Ehret, C., Aid-Launais, R., Sagardoy, T., Siadous, R., Bareille, R., Rey, S., . . . de Mones, E. (2017). Strontium-doped hydroxyapatite polysaccharide materials effect on ectopic bone formation.

- PLoS One, 12(9), e0184663.  
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0184663>
- El-Gohary, M.I., El-Dyn, S.M., Abd El-moniem, B.M., Al-Ashkar, E., Saleh, E.S., Tolba, E., & Soliman, I. (2012). Synthesis and Microstructure Characterization of Novel Sr-HA Prepared by Co-precipitation with Enhanced Bioactivity. *Egypt. J. Biophys. Biomed. Engng.*, 13, 73 - 85. [https://ejbbe.journals.ekb.eg/article\\_1194.html](https://ejbbe.journals.ekb.eg/article_1194.html)
- Elliott, J.C. (2013). *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*: Elsevier.
- Fernandes Cóta, L., Licona, K.P., Lunz, J., Antunes, A., Morejón, L., Varella, M., & Pereira, L.C. (2016). Hydroxyapatite nanoparticles: synthesis by sonochemical method and assessment of processing parameters via experimental design. *Materials Science Forum*, 869, 896-901. <https://www.scientific.net/MSF.869.896>
- Frasnelli, M., Cristofaro, F., Sglavo, V.M., Dirè, S., Callone, E., Ceccato, R., . . . Visai, L. (2017). Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 653-662. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116318793>
- Gaddam, V., Podarala, V., Rayaduram Venkata, S.K., Mukku, S.L., Devalam, R., & Kundu, B. (2022). Multi-ion-doped nano-hydroxyapatite-coated titanium intramedullary pins for long bone fracture repair in dogs—Clinical evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 110(4), 806-816. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.b.34960>
- Jodati, H., Yılmaz, B., & Evis, Z. (2020). A review of bioceramic porous scaffolds for hard tissue applications: Effects of structural features. *Ceramics International*, 46(10), 15725-15739. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884220308130>
- Kaygili, O., Keser, S., Kom, M., Eroksuz, Y., Dorozhkin, S.V., Ates, T., . . . Yakuphanoglu, F. (2015). Strontium substituted hydroxyapatites: synthesis and determination of their structural properties, in vitro and in vivo performance. *Materials science and engineering: C*, 55, 538-546. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493115301259>
- Kokubo, T., & Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 27(15), 2907-2915. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961206000457>
- Kumar, B., Jagannatham, M., Venkateswarlu, B., Dumpala, R., & Sunil, B.R. (2021). Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of strontium-substituted hydroxyapatite. *Journal of the Australian Ceramic Society*, 57(1), 195-204. <https://link.springer.com/article/10.1007/s41779-020-00525-6>
- Kumar, P., Saini, M., Dehiya, B.S., Sindhu, A., Kumar, V., Kumar, R., . . . Thakur, R. (2020). Comprehensive survey on nanobiomaterials for bone tissue engineering applications. *Nanomaterials*, 10(10), 2019. <https://www.mdpi.com/2079-4991/10/10/2019>
- LeGeros, R. (2002). Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 395, 81-98.
- LeGeros, R. (2008). Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chemical reviews*, 108(11), 4742-4753. <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cr800427g>
- Lide, D.R. (2005). *CRC handbook of chemistry and physics* (85th Edition ed. Vol. 85). New York: CRC press.
- Liu, Q., Huang, S., Matinlinna, J.P., Chen, Z., & Pan, H. (2013). Insight into biological apatite: physiochemical properties and preparation approaches. *BioMed research international*, 2013. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/929748/>
- Lunz, J., Licona, K.P., Antunes, A., Delgado, J.A., Morejón, L., & Varella, M. (2014). Effect of sonochemical technique on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles. Paper presented at the 58° Congresso Brasileiro de Cerâmica, Bento Gonçalves-RS, Brasil.
- Lunz, J., Licona, K.P., Antunes, A., Delgado, J.A., Morejón, L., & Varella, M. (2015). Effect of sonochemical technique on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles. *Materials Science Forum*, 820, 287-292. <https://www.scientific.net/MSF.820.287>
- Mahabole, M.P., Bahir, M.M., Kalyankar, N.V., & Khaimar, R.S. (2012). Effect of incubation in simulated body fluid on dielectric and photoluminescence properties of nano-hydroxyapatite ceramic doped with strontium ions. *J. Biomedical Science and Engineering*, 5, 396-405. [https://www.scirp.org/pdf/JBiSE20120700005\\_28315063.pdf](https://www.scirp.org/pdf/JBiSE20120700005_28315063.pdf)



- Morejón, L., Delgado, J.A., Bermúdez, S., Mendizábal, E., García-Vallés, M., & Martínez, S (2021). The role of sintering beginning temperature to develop hydroxyapatite porous nanostructured implants Paper presented at the II Congreso Digital de Nanobiotecnología y Bioingeniería Brasil.
- Morejón, L., Delgado, J.A., Antunes, A., Varella, M., Mendizábal, E., García, I., . . . Balmayor, E.R. (2019). Development, characterization and in vitro biological properties of scaffolds fabricated from calcium phosphate nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1790. <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/7/1790>
- Pu'ad, NAS Mohd, Koshy, P, Abdullah, HZ, Idris, MI, & Lee, TC. (2019). Syntheses of hydroxyapatite from natural sources. *Heliyon*, 5(5), e01588. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844018368944>
- Pupilli, F., Ruffini, A., Dapporto, M., Tavoni, M., Tampieri, A., & Sprio, S. (2022). Design Strategies and Biomimetic Approaches for Calcium Phosphate Scaffolds in Bone Tissue Regeneration. *Biomimetics*, 7(3), 112. <https://www.mdpi.com/2313-7673/7/3/112>
- Robinson, L., Salma-Ancane, K., Stipniece, L., Meenan, B.J., & Boyd, A.R. (2017). The deposition of strontium and zinc Co-substituted hydroxyapatite coatings. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 28(3), 1-14. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10856-017-5846-2>
- Šupová, M. (2015). Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceramics international*, 41(8), 9203-9231. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884215007336>
- Vukomanovic, M., Gazvoda, L., Anicic, N., Rubert, M., Suvorov, D., Müller, R., & Hofmann, S. (2022). Multi-doped apatite: Strontium, magnesium, gallium and zinc ions synergistically affect osteogenic stimulation in human mesenchymal cells important for bone tissue engineering. *Biomaterials Advances*, 140, 213051. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772950822003284>
- Xu, Y., An, L., Chen, L., Xu, H., Zeng, D., & Wang, G. (2018). Controlled hydrothermal synthesis of strontium-substituted hydroxyapatite nanorods and their application as a drug carrier for proteins. *Advanced Powder Technology*, 29(4), 1042-1048. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921883118300219>
- Xue, W., Moore, J.L., Hosick, H. L., Bose, S., Bandyopadhyay, A., Lu, W.W., . . . Luk, K. (2006). Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics. *Journal of biomedical materials research Part A*, 79(4), 804-814. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.a.30815>

*Este artículo no presenta conflicto de intereses*

### CONTRIBUCIÓN AUTORAL

**Lizette Morejón Alonso:** Conceptualización, metodología, caracterizaciones, análisis de datos, gestión de fondos, administración de proyectos, redacción del borrador original, revisión y edición.

**Sheyla Bermúdez Pérez:** Investigación, análisis de datos, validación y revisión documento.

**José Angel Delgado García-Menocal:** Conceptualización, caracterizaciones, análisis de datos, supervisión, redacción, revisión de documento.

**Eduardo Mendizábal Mijares:** Conceptualización, metodología, recursos, gestión de fondos, supervisión y revisión documento.