

HIDROXIAPATITA CARBONATADA, UNA OPCIÓN COMO BIOMATERIAL PARA IMPLANTES: UNA REVISIÓN DEL ESTADO DEL ARTE

Yesica Lorena Botero *

1: Ingeniera de Materiales, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
Master en Ingeniera de Materiales de Alto Desempeño, Universidad de Limoges. Limoges, Francia

*E-mail: yesica_botero@hotmail.com

RESUMEN: En los últimos 10 años, las investigaciones se han centrado en el desarrollo de biomateriales para la regeneración del tejido óseo. Los fosfatos de calcio son comúnmente utilizados para esta aplicación, ya que poseen composición química y estructura similar a la fase mineral del hueso natural. La hidroxiapatita fosfocálcica estequiométrica (HAp) es el material de referencia utilizado en la ingeniería biomédica, pero debido a que es muy estable químicamente y a que tiene una estructura muy rígida, posee una cinética de reabsorción muy baja en medio fisiológico y presenta bajas propiedades mecánicas lo que limita su aplicación. De acuerdo a esto, en la búsqueda de obtener un material que se acerque cada vez más al hueso natural, surge el interés por el estudio de la Hidroxiapatita fosfocálcica carbonatada (HAC), la cual es derivada de la hidroxiapatita fosfocálcica estequiométrica y con importantes reportes en propiedades de biocompatibilidad, osteoinducción, osteoconducción y biodegradabilidad, propiedades que hacen de éste un biomaterial con un gran potencial para uso en la ingeniería de tejidos. El objetivo de este artículo, es ofrecer una revisión de la información reportada hasta el momento respecto al uso de las hidroxiapatitas fosfocálcicas carbonatadas como material de implante, se mencionarán sus propiedades fisicoquímicas, estructurales y morfológicas, los principales métodos de preparación, elaboración de preformas, las técnicas de caracterización y su comportamiento biológico.

Palabras Clave: Hidroxiapatita fosfocálcica estequiométrica, Hidroxiapatita fosfocálcica carbonatada, Biocompatibilidad, Biodegradabilidad

CARBONATED HYDROXYAPATITE, AN OPTION AS BIOMATERIALS FOR IMPLANTS: A REVIEW OF THE STATE OF THE ART

ABSTRACT: In the last 10 years, the research has been focused on the biomaterials development for bone tissue regeneration. Calcium phosphate are commonly used for this application due to its chemical composition and structure are similar to the mineral phase of the natural bone. The stoichiometric hydroxyapatite (HAp) is the reference material used in the biomedical engineering due to it has chemical stability and it has a very rigid structure, it has a very low reabsorption kinetic in a biological fluid as well. Additionally, its low mechanical properties limits their application. According to this, the searching to obtain a material as similar as possible to the natural bone, it had been focused to the study of carbonated hydroxyapatite (HAC), which is derived from the stoichiometric hydroxyapatite (HAp) and it counts with important reports in biocompatibility, osteoinduction, osteoconduction and biodegradation, making to this a biomaterial of great potential for uses in tissue engineering. The objective of this paper is to provide

a review of the information reported regarding the use of carbonated hydroxyapatite (HAC) as implant material; in this order of ideas, the physico-chemical, structural and morphological properties will be mentioned, as well as the synthesis methods, and techniques to characterize it.

Keywords: Stoichiometric hydroxyapatite, Carbonated hydroxyapatite, Biocompatibility, Biodegradation

1. INTRODUCCIÓN

El interés por el estudio los biocerámicos, data del año 1770, donde se mostró que sus propiedades físico químicas y cristalográficas, poseían una gran similitud a la fase mineral del hueso natural. No obstante, solo hasta el siglo XIX, éste tipo de material tomó especial interés en el área biomédica, ya que a partir de este momento hubo mayor acceso a la información, permitiendo así retomar todo el conocimiento que se encontraba perdido y de esta manera se profundizó en el estudio de este tipo de biomaterial [1].

Para el siglo XX, el campo de los biocerámicos ya era muy estudiado y trabajado. Esto se debió por un lado al crecimiento poblacional que trajo consigo el fenómeno de la movilización en medios mecánicos lo que generó más accidentes y por ende traumatologías severas por fracturas en el sistema óseo.

Por otro lado, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en su informe presentado en diciembre de 2015, más de mil millones de personas padecían de una discapacidad que correspondía al 15% de la población mundial, donde enuncia que entre 100 y 190 millones de los afectados son adultos, por lo cual el incremento de esta cifra se vio directamente influenciado por la longevidad de la población y el aumento de enfermedades crónicas como el cáncer, la diabetes, enfermedades cardiovasculares, entre otras, las cuales pueden desencadenar enfermedades secundarias como infecciones urinarias, la osteomielitis y la osteoporosis, estas dos últimas afecciones deterioran y comprometen la morbilidad del cuerpo y por ende el desempeño funcional de las personas.

De acuerdo a esto, la demanda de intervenciones quirúrgicas ha sido cada vez mayor, creando así una necesidad alarmante por parte de los afectados de adquirir por medio de su sistema de salud una solución rápida, la cual le garantice un bienestar, incrementando de esta manera la expectativa de vida de las personas.

A causa de esta problemática y del hecho de que la capacidad de autoreparación del hueso natural es lenta respecto a la demanda, se ha venido trabajando en el desarrollo de biomateriales sintéticos como sustitutos óseos para restaurar, mantener o mejorar su función [2]. Para tal fin, los fosfatos de calcio son comúnmente utilizados como sustitutos óseos, gracias a su composición química, cercana a la del hueso natural y a que poseen propiedades de biocompatibilidad que permite su utilización en este campo [3] [4].

Los fosfatos de calcio, son una familia de compuestos químicos que se diferencian de acuerdo a la relación molar Ca/P, los principales son: la Hidroxiapatita fosfocálcica estequiométrica (HAp), fosfato tricálcico (β -TCP y α -TCP), formulaciones bifásicas (fosfatos bifásicos), trifásicas y

multifásicas [5]. Cada uno presenta diferentes propiedades, lo que permite potencializar el uso de cada tipo de apatita según la aplicación prevista.

Desde el punto de vista biomédico, para que un material cerámico sea considerado como material de implante, éste debe cumplir con diferentes propiedades. A nivel biológico debe poseer bioactividad, biodegradabilidad, osteoconducción y osteoinducción [6][7]. Mecánicamente debe poseer una resistencia a la fatiga, compresión y tensión similar a la de la zona del hueso en la que se desea implantar.

De los fosfatos de calcio mencionados anteriormente, la Hidroxiapatita fosfocálcica estequiométrica (HAp), posee una excelente biocompatibilidad, es bioestable y osteoconductiva, lo que la hace un material de referencia para el desarrollo de andamiajes para la ingeniería de tejidos [8]. Sin embargo, este tipo de biomaterial presenta algunas limitantes en su aplicación, debido a que químicamente sus enlaces iónicos son muy fuertes lo que conlleva a que sea dura y frágil disminuyendo así sus propiedades mecánicas por lo que dicha apatita no puede ser utilizada en zonas que requieren soportar grandes cargas, además su cinética de reabsorción es muy lenta, disminuyendo así, su capacidad osteoinductiva, además de que representa un problema, pues el implante debe ser reemplazado progresivamente por el nuevo tejido óseo que se forma [6] [9].

Para mejorar la capacidad de osteoinducción de la HAp, métodos como realizar un material compuesto a partir de un cerámico y un polímero, son comúnmente utilizados ya que se han obtenido muy buenos resultados como material de implante [8], sin embargo uno de los objetivos de esta revisión es mostrar las investigaciones que se han llevado a cabo con la finalidad de potencializar las propiedades y funciones de la HAp y cómo es posible volverlo un material para el uso de la ingeniería de tejidos.

En este sentido, una característica muy importante que posee la HAp, es a nivel de su estructura, la cual permite que se le realicen numerosas sustituciones de iones o grupos iónicos. Dichas sustituciones, generan una serie de perturbaciones en su estructura cristalina lo que hace que la cristalinidad disminuya [10], por lo tanto, aumenta su capacidad de reabsorción en medio fisiológico. De las sustituciones comúnmente utilizadas se encuentran los iones carbonato, que se encuentran en una concentración de 4 a 8% en peso en el hueso natural [11] [12]. Esta modificación en la estructura de la HAp, da como resultado una Hidroxiapatita Carbonatada (HAC) la cual posee las mismas propiedades fisicoquímicas que la HAp, además de mejorar su cinética de absorción (más rápida) y sus propiedades mecánicas, logrando así un biomaterial que posee propiedades cada vez más similares a las del hueso natural [10].

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, la HAC genera un gran interés como material con potencial para ser usado en la ingeniería de tejidos, es entonces esta revisión bibliográfica el medio por el cual se pretende mostrar el trabajo científico que se ha venido desarrollando respecto a este tipo de biomaterial hasta la actualidad y las aplicaciones previstas.

2. CONCEPTOS GENERALES

2.1. Apatitas naturales

El tejido óseo natural es similar a un material compuesto, ya que se encuentra constituido fundamentalmente por fibras orgánicas y colágeno inscritas en una matriz mineral conocida como fosfato de calcio apatítico polisustituido [13]. La composición másica del hueso natural es

aproximadamente 60% fase mineral, 15% fase orgánica y 25% de agua [14], su estructura está formada por dos tipos de hueso: cortical o denso, el cual representa cerca del 80% de la masa ósea que le da resistencia a esfuerzos mecánicos y el trabecular o poroso que constituye el 20% de su masa restante, el cual interviene en los intercambios metabólicos, es decir, en la regeneración ósea. El porcentaje másico del hueso correspondiente a la fase mineral está compuesta fundamentalmente por Ca, P y CO₂ (Ca=36.6%; P=17.1%; CO₂= 4.8%), lo que le confiere su carácter apatítico [15].

2.2. Apatitas sintéticas

El uso de fosfatos de calcio como sustitos óseos se ha venido implementado por más de 40 años [10], gracias a que su composición química, propiedades físicas y morfológicas se asemejan cada vez más a la fase mineral del hueso natural. Para el presente estudio se abordarán solo dos tipos de apatitas, la Hidroxiapatita fosfocálcica estequiométrica (HAp) y Hidroxiapatita carbonatada (HAC). Como se enunció en la parte introductoria.

2.2.1 Hidroxiapatita fosfocálcica estequiométrica (HAp)

La Hidroxiapatita fosfocálcica estequiométrica (HAp), de fórmula química Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ y relación molar Ca/P=1,67, cristaliza en el sistema hexagonal según el grupo espacial P6₃/m, lo que le permite ser la fase más estable en medio fisiológico de la familia de fosfatos de calcio. Sin embargo, esta gran estabilidad hace que tenga una baja cinética de reabsorción y por ende una baja solubilidad [9] [13] [16] [17] [18]. Para mejorar estas propiedades, la HAp posee a nivel estructural dos túneles en los cuales es posible realizar sustituciones de iones mono o polivalentes, dichas sustituciones generan en la apatita una disminución en la estabilidad térmica durante la sinterización de la HAp, así como un aumento en la solubilidad [5] [10] [14] [19] [20]. Las sustituciones como aniones de silicato, fluoruro y carbonato son usualmente las más implementadas.

2.2.2 Hidroxiapatita fosfocálcica carbonatada (HAC)

La fase inorgánica del tejido óseo se parece a una apatita sintética polisustituida, por lo que uno de los iones que se puede sustituir es el ion carbonato CO₃²⁻ [9] [14] [16] [21], que se encuentra en una concentración entre el 4 y el 8 % en peso en la fase mineral del hueso natural. Este tipo de ion puede sustituirse por medios físico-químicos, ya sea en los sitios del hidroxilo OH⁻ o del fosfato PO₄³⁻ que se encuentran presentes en la estructura de la HAp. Esta modificación da como resultado una apatita parcialmente sustituida o apatita deficiente en calcio, que se conoce como Hidroxiapatita Carbonatada (HAC) [9] [14] [17] [22] [23]. Para este tipo de apatitas la relación molar Ca/P=1,67, es constante en toda la reacción química garantizando que se trate de una apatita fosfocálcica, además una nueva relación molar carbonato/fosfato (CO₃²⁻/PO₄³⁻), entra a participar como un parámetro fundamental en la composición y en el comportamiento de la HAC. Actualmente este tipo de sustitución es poco investigado, porque su síntesis y sinterización requieren controlar diversos fenómenos físicos-químicos, como la formación de fases secundarias durante el tratamiento térmico que son nocivas para la salud, descarbonatación (perdida iones CO₃²⁻), etc, que influyen en el desempeño de la HAC. Es por esto que la mayor parte de las investigaciones se han centrado en desarrollar el método idóneo para la obtención de este tipo de biomaterial, sin embargo, ya se han realizado algunos estudios histopatológicos y de

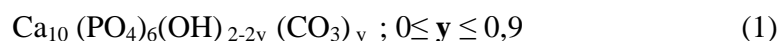
biocompatibilidad, que muestran que la Hidroxiapatita Carbonatada es biodegradable, osteoinductiva y biocompatible [2] [11] [12] [19] [24]. Dichos estudios se citarán más adelante durante el desarrollo de la revisión bibliográfica.

3. TIPOS DE HIDROXIAPTITAS CARBONATADAS

Diferentes formulaciones de HAC, han sido propuestas de acuerdo al sitio que ocupa el CO_3^{2-} , ya sean sitios hidroxilo OH^- o de fosfato PO_4^{3-} .

3.1. Hidroxiapatita carbonatada tipo A (HAC-A)

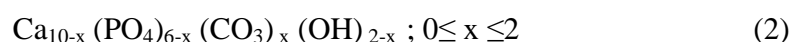
Los iones carbonato encuentran lugar en los sitios OH. En la reacción 1, “y” es la cantidad de iones CO_3^{2-} que sustituyen los iones OH. La apatita conserva la simetría hexagonal de la HAp, en tanto que “y” se mantenga inferior a 0,9. La reacción 1, representa la fórmula química de la HAC-A [19].



La composición química final de este tipo de apatita depende directamente de la temperatura y la atmósfera en que se trabaje, por esto es necesario controlar durante la sinterización la presión de CO_2 y de vapor de agua [10] [14].

3.2 Hidroxiapatita carbonatada tipo B (HAC-B)

Los iones PO_4^{3-} son reemplazados por los iones CO_3^{2-} . En la reacción 2, “x” es la cantidad de iones carbonato que sustituyen los iones PO_4^{3-} . Este tipo de apatita cristaliza en el sistema hexagonal y es isomorfa a la HAp. La reacción 2, representa la fórmula química de la HAC-B.



Este tipo de apatita, presenta dificultad para su sinterización ya que se descompone por descarbonatación a bajas temperaturas ($\sim 600^\circ\text{C}$). Este fenómeno se da debido a la sustitución de iones CO_3^{2-} , el cual genera una serie de perturbaciones en la estructura de la HAp disminuyendo su parámetro de red lo que se manifiesta por medio de inestabilidad térmica y una cinética de reabsorción más rápida respecto a la HAp.

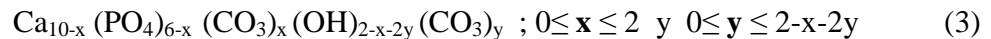
Para brindar estabilidad térmica a la apatita tipo B, es necesario realizar la sinterización en atmósfera controlada de CO_2 y controlar parámetros como la temperatura, presión de CO_2 y concentración de iones CO_3^{2-} (relación molar $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$) [10] [15] [20] [25].

3.3. Hidroxiapatita carbonatada tipo AB (HAC-AB)

La apatita biológica natural posee estos dos tipos de sustituciones al tiempo en su estructura, estas pueden coexistir ya que no existe ninguna conexión entre la concentración de los iones CO_3^{2-} en el sitio A y en sitio B, esto se observa en las reacciones 1 y 2, cada una ocupa un sitio

determinado. Es entonces posible obtener también una apatita tipo AB sintética, a partir de formulaciones químicas en las cuales se debe tener en cuenta parámetros como la relación molar Ca/P y C/P (relación molar $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$) en su composición.

La Hidroxiapatita carbonatada tipo AB, cristaliza en el sistema hexagonal, como la Hidroxiapatita tipo A y tipo B. Los iones carbonato sustituye a los iones PO_4^{3-} y a los iones OH^- [14] [26] [27]. La reacción 3, representa la fórmula química de la HAC-AB.



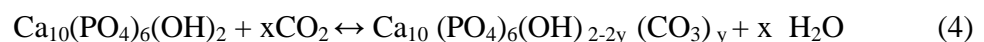
En la sección 4 y 5, se mostrarán los diferentes métodos de obtención de cada una de estas apatitas, donde se evalúa la importancia de tener en cuenta todos los parámetros enunciados para su correcto procesamiento.

4. SÍNTESIS DE HIDROXIAPTITAS CARBONATADAS

El proceso de elaboración de la HAC comienza por la síntesis del polvo. Existen diversos modos de preparación de Hidroxiapatitas carbonatadas ya se por vía seca, húmeda o a altas temperaturas. Los polvos obtenidos por cada uno de estos métodos presentan diferentes características estructurales, morfológicas y químicas. Por lo tanto, la elección del método va a depender de la aplicación prevista [9][21].

4.1. Hidroxiapatita carbonatada tipo A (HAC-A)

La síntesis de la HAC-A vía hidrotermal, es el método usualmente utilizado para su obtención, éste se realiza a alta temperatura, en atmósfera de CO_2 y con presión parcial de agua. La reacción 4, muestra el equilibrio químico que se forma [20].



Las atmósferas de CO_2 y vapor de agua, son indispensables en la síntesis de la HAC-A (ver reacción 4), ya que garantizan que el equilibrio químico se mantenga y la obtención de una HAC-A monofásica. Como este método es a altas temperaturas y altas presiones, se obtiene un material puro, muy cristalino y con bajo contenido de carbonato. Es posible obtener también apatita carbonatada tipo B y tipo AB, pero la dificultad yace en las altas temperaturas de síntesis que hace que se descompongan fácilmente [9][14][21][22] [28][29].

4.2. Hidroxiapatita carbonatada tipo B (HAC-B)

La síntesis de hidroxiapatita carbonatada tipo B se realiza vía húmeda a presión atmosférica, los métodos más utilizados para su preparación son directa e inversa.

Legeros y otros. Propusieron el método directo, el cual consiste en la adición lenta de una solución de acetato de calcio en la solución que contiene fosfato diamónico y el carbonato monosódico, el cual varía de acuerdo a la relación molar $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$. La reacción es realizada

por un tiempo de 1.5 horas a 95 °C. Después de cumplido este tiempo, el precipitado obtenido es filtrado y lavado con agua destilada hasta llevarlo a un pH neutro. Finalmente, se seca en la estufa para eliminar agua y residuos de la síntesis. Éste es un método muy sencillo y reproducible, además, proporciona una gran concentración de iones carbonato, pero el uso del carbonato monosódico como agente precursor, al reaccionar en la solución genera un aumento en la concentración de sodio superior a 5,5 %, el cual precipita como ion alcalino alterando así la composición de la hidroxiapatita carbonatada tipo B [26][30].

Por otro lado, en la búsqueda de obtener apatitas carbonatadas exentas de iones alcalinos, Labarthe, propone reemplazar el precursor de carbonato de sodio por carbonato de amonio y realiza la precipitación vía acuosa de tipo inverso, la cual consiste en la adición gota a gota de la solución que contiene los iones fosfato y carbonato en la solución de calcio, de esta manera se evita que los iones amonio provenientes del carbonato de amonio se formen una vez entran en contacto con la solución de calcio debido a que esta se encuentra en exceso [14][25][31][32][33].

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, el método directo siempre va a favorecer el exceso de iones alcalino y amonio frente a los iones calcio, por lo que el método inverso es comúnmente utilizado para la obtención de polvos de HAC-B monofásicos.

Lafon (2004), en su trabajo sobre la síntesis y sinterización de Hidroxiapatitas carbonatadas, usa el método tipo inverso para la elaboración de la apatitas tipo B, donde muestra que la tasa de carbonatación (relación molar $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$), el pH, la temperatura, la atmósfera y la concentración de reactivos (relación molar Ca/P), son parámetros que definen la naturaleza y cristalinidad de los polvos de HAC-B. El autor usa como precursores una solución de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) y una solución que contiene los iones carbonato (NH_4) HCO_3 y fosfato (NH_4) $_2$ HPO_4 , mantiene constante la relación molar Ca/P= 1,67 durante toda la síntesis para garantizar que se trate de una apatita fosfocálcica y realiza diferentes mezclas de apatitas con concentración C/P variable con el fin de evaluar el comportamiento de cada una y comparar su desempeño [14]. Por medio de diferentes técnicas de caracterización identifica las características físico-químicas, estructurales y morfológicas para cada compuestos que preparó, obteniendo los siguientes resultados: la hidroxiapatita carbonatada tipo B es monofásica, mantiene una estructura y composición apatítica en tanto que x (tasa de carbonatación) cumpla con el valor $0 \leq x \leq 2$ estipulado para las apatitas tipo B y demuestra que los iones carbonato en efecto son sustituidos en los iones fosfato (sitios B). En conclusión, la síntesis de la HAC-B tipo inverso, es un método versátil, reproducible y confiable.

4.3. Hidroxiapatita carbonatada tipo AB (HAC-AB)

La síntesis se realiza por el método de vía seca, el cual consiste en la mezcla de dos polvos CaCO_3 y α -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), los cuales son tratados a alta temperatura (1300°C a 1500°C) y presión de argón de 55 Mpa. Se obtienen monocristales de HAC-AB, la tasa de carbonatación para los sitios A es de aproximadamente 6,25% y en los sitios B de 2,5% [34].

Carretero, Bernal, Torres, Jamuna y Fadzil Ayad 2009, utilizaron este método vía seca en su trabajo sobre la evaluación de la biocompatibilidad de Hidroxiapatitas carbonatadas, donde caracterizaron el material obtenido por pruebas biológicas como cultivos celulares y pruebas

bioquímicas para evaluar su respuesta *in vitro* [24]. En la sección 7, se profundizará en los resultados obtenidos por estos autores.

Para finalizar esta sección, es válido mencionar que existen más métodos para obtener este tipo de apatitas, pero no han sido expuestos aquí dado que algunos de éstos son complejos lo que limita su reproducibilidad, además, en ocasiones presentan limitantes en cuanto a su aplicación, puesto que presentan variaciones en la composición ya sea por la formación de fases secundarias o impurezas, por lo que esta revisión se limitó en mostrar los métodos que por su trayectoria y aplicación son los más utilizados y los que han mostrado resultados satisfactorios.

5. SINTERIZACIÓN DE HIDROXIAPATITAS CARBONATADAS

La etapa de sinterización es de gran importancia en la elaboración de materiales con aplicación en la ingeniería de tejidos, ya que ésta da las propiedades finales con la que contará el material, como su composición monofásica, porosidad, morfología, etc.

Las Hidroxiapatitas carbonatadas presentan una baja estabilidad térmica durante el tratamiento térmico ya que son apatitas deficientes en calcio, lo cual se debe a las sustituciones realizadas en su estructura. Su habilidad de sinterización se ve condicionada entonces por la tasa de carbonatación (relación molar $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$), las propiedades químicas y físicas del material, la atmósfera (gas inerte, CO_2 , etc.) y el tipo de difusión que se da durante la sinterización (consolidación o densificación), por lo que la sinterización para cada tipo de apatita A, B o AB, tendrá un tratamiento térmico específico. En general, la problemática que presenta la sinterización de este tipo de apatitas es lograr densificar el material sin descomponerlo, con el fin de evitar la formación de fases secundarias nocivas para el organismo.

En este sentido, previo a la sinterización, es necesario evaluar la estabilidad térmica de las apatitas carbonatadas, para ello, diferentes análisis térmicos han sido propuestos dentro de los cuales se encuentran análisis termogravimétricos, termodiferenciales y dilatométricos. Cada uno de estos es realizado bajo el control de diferentes atmósferas: gas inerte (Ar, N_2 , O_2), CO_2 seco (100% CO_2) o húmedo (X% CO_2 y Y% H_2O). Por medio de estos análisis, se puede conocer la evolución de las características del material hasta la temperatura máxima de sinterización antes de la descomposición del mismo, y así determinar el tratamiento térmico que conviene para cada tipo de apatita [35].

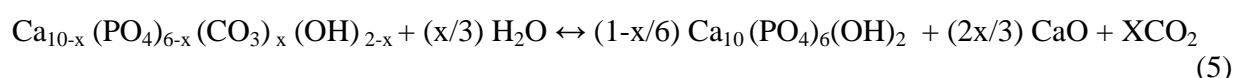
5.1. Sinterización hidroxiapatita carbonatada tipo A (HAC-A)

Como se mencionó en la sección 4.1, este tipo de apatita se descompone en los sitios OH^- (sitios A) donde se insertan los iones CO_3^{2-} . Análisis termogravimétricos realizados en atmósferas de gas inerte (Ar) y aire, han mostrado el fenómeno de descomposición que ocurre en la HAC-A, los resultados obtenidos muestran que la HAC-A, sufre una descarbonatación máxima aproximadamente a 900°C . En atmósfera inerte de Ar, se da una liberación de iones de CO_3^{2-} que se presenta en forma de gas carbónico y en aire muestra la presencia de agua [15][36]. Este fenómeno es analizado por Lafon (2004), el cual concluye que la descomposición de la HAC-A se interpreta mejor como una evolución de ésta en una oxyapatita la cual es isomorfa de la HAp. De acuerdo a esto, es que comúnmente para la sinterización de este tipo de apatita son

implementadas dos tipos de atmósferas, CO₂ y presión parcial de agua para mantener el equilibrio químico (ver ecuación 4) y evitar su descomposición.

5.2. Sinterización hidroxiapatita carbonatada tipo B (HAC-B)

Numerosos estudios muestran que el tratamiento térmico de la HCA-B en aire es susceptible a descomponerse por deshidratación (pérdida de agua) y descarbonatación (salida de los iones CO₃²⁻ de los sitios B). La descarbonatación está acompañada de la formación de una o más fases secundarias (CaO, CaCO₃ o liberación de CO₂), como lo muestra la ecuación 5. La naturaleza de estas fases secundarias está ligada directamente al valor de la relación molar Ca/P de la apatita inicial, la naturaleza y cantidad de los iones de CO₃²⁻, la temperatura y la atmósfera utilizada durante el tratamiento térmico.



Para este tipo de apatitas el valor de Ca/P es superior a 1,67 este valor se puede verificar en la fórmula química de la apatita tipo B (ver ecuación 2), cualquiera sea el valor de “x”. Para evitar la descomposición de la HAC-B, es necesario realizar el tratamiento térmico en atmósfera controlada de CO₂, ya que permite estabilizar la fase inicial de la HAC-B a altas temperaturas y permite desplazar el equilibrio en el sentido que favorece la formación de la HAC-B (izquierda) [10][14][37].

De acuerdo a Lafon, Champion y Bernache Assollant, para realizar la sinterización de este tipo de apatitas carbonatadas, dos factores son fundamentales: la tasa de carbonatación y el control de la atmósfera. Con respecto a la atmósfera, la presión parcial de CO₂ influye directamente en la temperatura a la cual comienza la descarbonatación de los sitios B, como se observa en la Figura 1, para la presión de 1 bar, la temperatura de sinterización se encuentra 200° C por encima de la temperatura a la presión de 10⁻³ bar, con lo que se concluye que entre más alta sea la presión de CO₂ la temperatura a la cual comienza la descarbonatación en los sitios B es mayor, es decir permite tener un mayor rango de temperaturas de sinterización sin descomposición.

Por otro lado, en cuanto a la tasa de carbonatación, a bajas tasas de carbonatación la temperatura a la cual comienza la descomposición será más elevada. En la Figura 1, se evalúa este comportamiento tomando como ejemplo, la presión de 1 bar, donde se observa que con una tasa de carbonatación de 0,4 su temperatura es de aproximadamente 1100°C y para una tasa de carbonatación de 1,6 su temperatura es de aproximadamente 950°C. Este análisis se puede realizar también con la curva a 10⁻³ bares de presión y se obtiene el mismo comportamiento. [10][38].

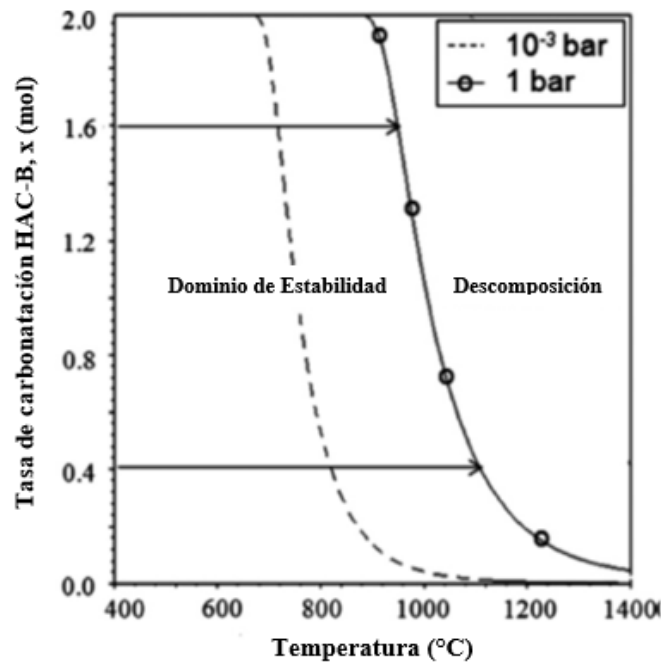


Figura 1. Curvas de descarbonatación de la HAC-B en atmósfera de CO₂, modificado de [38].

5.3. Sinterización hidroxiapatita carbonatada tipo AB (HAC-AB)

Para la sinterización de este tipo de apatitas, es necesario utilizar una atmósfera de CO₂, como en el caso de la HAC-B, ya que en el seno de la apatita tipo AB, se encuentran las sustituciones en los sitios B, que son las que generan mayores dificultades en la etapa de sinterización, como se vio en el numeral 5.2 [14]. Por lo tanto, parámetros como la tasa de carbonatación en los sitios A y B, la atmósfera de CO₂, la presión de CO₂, son fundamentales en el proceso de sinterización de la HAC-AB para obtener un material de composición química y microestructura controlada.

6. PROPIEDADES DE LOS FOSFATOS DE CALCIO

Actualmente, las apatitas carbonatadas son poco investigadas por lo que no se cuenta con mucha bibliografía que muestre sus propiedades características y su comportamiento en medio fisiológico. Sin embargo, como las apatitas carbonatadas hacen parte de la gran familia de fosfatos de calcio, éstas presentan similitud en sus propiedades mecánicas y eléctricas, su morfología y composición química, por lo que en este artículo se enunciará de manera general lo que la literatura ha reportado hasta el momento respecto a las apatitas en general y en lo posible alguna propiedad característica de las HAC.

6.1. Propiedades mecánicas

Las apatitas fosfocálcicas son materiales cerámicos, los cuales son inorgánicos y pueden poseer estructuras amorfas o cristalinas, su aplicación puede ser estructural para la sustitución de tejido dañado, para mejorar biocompatibilidad como formación de capas de apatitas sobre un sustrato, y

para inducir el crecimiento del hueso, así como para la liberación de moléculas activas (proteínas, fármacos), etc. Como es conocido, una de las principales demandas que tiene un biomaterial para ser considerado como material de implante, es soportar cargas mecánicas cíclicas, que dependiendo del lugar de implantación su resistencia deberá ser mayor o menor.

Los biocerámicos presentan algunas limitaciones en su aplicación debido a que son frágiles, esto se explica a nivel atómico, ya que los cerámicos están formados por enlaces iónicos muy fuertes lo que hace que no se deforman plásticamente antes de facturarse, sino que sucede una fractura directa. Por lo cual, para las biocerámicos de fosfato de calcio sus propiedades mecánicas se ven determinadas por la composición química, cristalinidad, límites de grano y porosidad del material. En conclusión, los fosfatos de calcio presentan baja resistencia al impacto y a la fractura, limitando así su aplicación a zonas que no requieren resistir cargas cíclicas.

Sergey (2013), toma como ejemplo representativo de las apatitas a la hidroxiapatita fosfocálcica estequiométrica (HAp), la cual posee una tenacidad a la fractura de $\sim 1,2 \text{ MPa(m)}^{1/2}$, mucho menor, en comparación con la del hueso que es $\sim 2-12 \text{ MPa(m)}^{1/2}$. Además, el autor muestra por medio del análisis de la cristalinidad y los límites de grano, que la resistencia a la fractura decrece con un incremento del tamaño de grano, por lo que la etapa de sinterización es decisiva en la composición química, estructural y morfológica de las apatitas. Por otro lado, en cuanto a su composición química establece como aumenta o disminuye la resistencia a la fractura de cada apatita de acuerdo a la relación molar Ca/P, por lo cual, con $\text{Ca/P}=1,67$ la resistencia a la fractura es máxima y con $\text{Ca/P} > 1,67$, la resistencia a la fractura disminuye. En cuanto a la porosidad establece que la resistencia decrece exponencialmente con el incremento de porosidad en su estructura.

Finalmente, las propiedades eléctricas de los fosfatos de calcio, es un tema de estudio que ha venido tomando bastante interés en los últimos 10 años, ya que cada vez más interesa obtener un biomaterial capaz de servir como soporte y de albergar y transportar en su estructura moléculas activas para la liberación controlada de éstas una vez implantadas en el organismos, por lo cual, el método de polarizar la superficie de una biocerámica de fosfato de calcio por medio de un campo eléctrico potencializa el uso de las apatitas en la ingeniería de tejidos, ya que acelera la formación de células de osteoblastos, lo que hace que haya una mejor bioactividad la cual mejora el crecimiento del hueso a través del implante. Este método ya se ha implementado en los fosfatos de calcio como la HAp y la HAC los cuales mostraron el comportamiento descrito anteriormente [5].

6.2. Porosidad

Un material utilizado como implante no solo debe cumplir con propiedades mecánicas cercanas a la del hueso natural, además debe tener la capacidad de fijarse bien a la estructura del hueso, garantizar que no haya ningún tipo de rechazo y que haya constantemente un intercambio celular implante- hueso, para evitar que el tejido óseo en formación se muera (regeneración ósea). Es por esto que es necesario que la estructura de la apatita sea porosa, pues por medio de estos poros se forma una unión química implante- hueso que los consolida como un solo sistema.

Si bien es cierto que la porosidad reduce la resistencia mecánica del material de implante, es necesario en todo caso elaborar la pieza porosa pues debe asemejarse a la estructura del hueso

que se compone fundamentalmente por dos partes, una porosa o trabecular que es la parte interna del hueso, que se encarga de toda la acción enzimática, proliferación celular y diferencia celular para la regeneración del hueso y la parte externa, que es el hueso denso o cortical que se encarga de resistir los esfuerzos mecánicos a los que está expuesto constantemente el hueso. En este sentido, es entonces indispensable conocer a profundidad los diferentes tipos y tamaños de poros que existen y como modifican éstos la estructura y comportamiento del material en medio fisiológico [5][39][40].

Para las aplicaciones biomédicas, generalmente se trabaja con materiales porosos conocidos comúnmente como materiales reticulados, su estructura está compuesta por dos tipos de poros abiertos y cerrados. Los poros abiertos ($> 100 \mu\text{m}$), se encuentran interconectados lo que permite que haya una relación directa entre el implante y el hueso permitiendo que éste último crezca a través del implante y forme así el nuevo hueso. Otro aspecto fundamental de la porosidad abierta, es que ofrece una mayor superficie de contacto lo que genera una mayor adhesión celular y por ende crecimiento del hueso. Los poros cerrados o asilados, son poros que residen en la pieza aún después de la sinterización, es recomendable eliminar al máximo este tipo de porosidad pues pueden convertirse en una vía para que el material falle mecánicamente. Este tipo de porosidad puede eliminarse a través de los límites de grano, entre más cerca se encuentre el poro cerrado al límite de grano, más fácil será eliminarlo por medio de un tratamiento térmico alterno [40].

La microporosidad ($<10\mu\text{m}$), es otro aspecto importante a considerar para la elaboración de piezas porosas cuando éstas van a albergar algún tipo de molécula activa, ya que éste tipo de porosidad proporciona un incremento en la solubilidad iónica y una gran área superficial de adsorción de proteínas, antibióticos, etc [41].

Para concluir, hay diferentes métodos por los cual se puede inducir porosidad a un material, por ejemplo por la adición de material orgánico como fibras, que se descomponen a una temperatura menor que la temperatura de sinterización del biocerámico, otras opciones son la adición de partículas, agente porogénico, tratamiento con gases a altas temperaturas, etc. [5][39].

6.3. Propiedades biológicas

La biocompatibilidad, osteoconducción, osteoinducción y biodegradabilidad son propiedades que poseen los fosfatos de calcio. La biocompatibilidad es común a todos los fosfatos de calcio, pero dependiendo de su composición química, características físico-químicas y morfológicas pueden poseer o no las otras.

En el caso de las Hidroxiapatitas carbonatadas, la mayor parte de investigadores se han centrado en mejorar su procesamiento y todos los parámetros que se deben tener en cuenta para su elaboración y obtención. Sin embargo, algunos autores como Carretero y otros, en su trabajo sobre la evaluación de la biocompatibilidad de la apatita carbonatada y Estupiñan y otros, en su trabajo sobre análisis histológicos de la Hidroxiapatita carbonatada, muestran su comportamiento a nivel biológico a partir de una hidroxiapatita carbonata tipo AB porosa, que nombraron CAP elaborada vía seca. Diferentes ensayos fueron realizados por los autores, como ensayos de citotoxicidad, ensayos en fluido corporal simulado SBF, adhesión de osteoblastos, inhibición bacteriana, entre otros, con lo cual obtuvieron los siguientes resultados:

Por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), compararon las superficies de la HAC-AB antes y después de estar sumergido en SBF, ver Figura 2, donde observaron que la apatita tipo AB, antes de ser introducida en medio fisiológico, (Figura 2a) mantenía su estructura cristalina y superficie lisa características de un material sinterizado. Luego de la inmersión, (Figura 2b), la apatita mostraba cristales amorfos que correspondían al fosfato de calcio precipitado sobre el material, esta nueva formación superficial le confiere al material propiedades para mejorar la adhesión celular, por lo cual se evidenció una adhesión y proliferación celular sobre la hidroxiapatita carbonatada tipo AB [24].

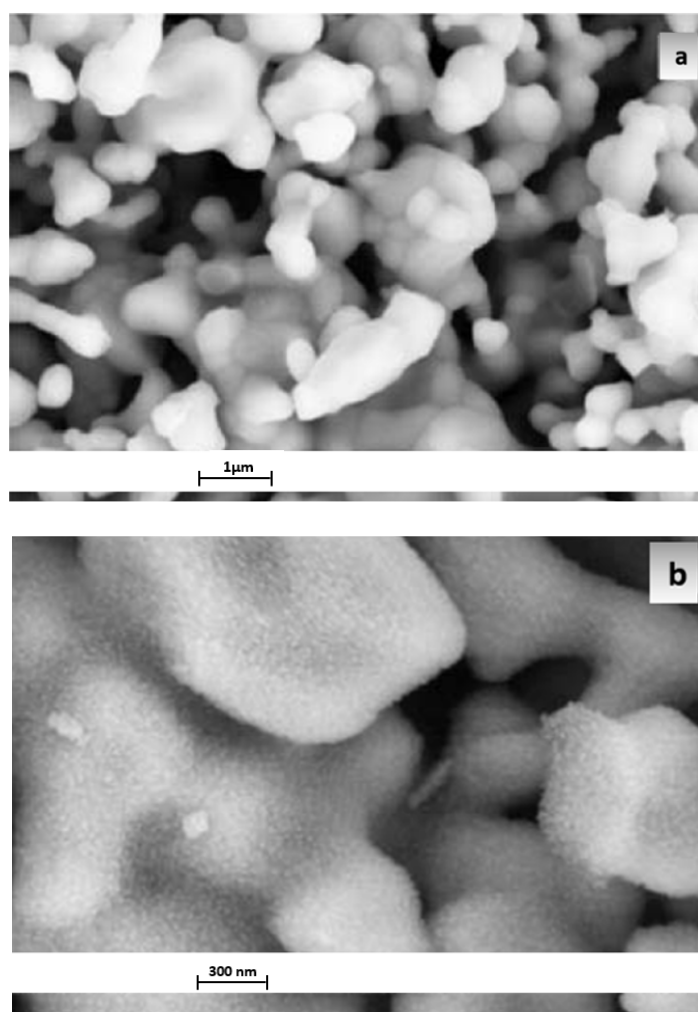


Figura 2. Micrografías tomadas mediante MEB de hidroxiapatita carbonatada tipo AB vía seca, en medio SBF, a) barra de 1 μm y b) barra de 300 nm, modificado de [24].

7. FORMAS DE BIOCERÁMICOS

Un biomaterial cerámico puede presentar diferentes formas, según su proceso de obtención, por ejemplo, cementos inyectables, granulados, bloques porosos o densos, polvos, andamios (scaffolds), etc.

Los bloques son comúnmente utilizados como sustitutos óseos, éstos poseen normalmente una geometría circular y rectangular, hay diferentes configuraciones para cada una de estas geometrías que se clasifican según la porosidad deseada para cada pieza y de acuerdo a la aplicación prevista.

En los bloques rectangulares una de las configuraciones más utilizadas es conocida como “capa superior porosa y fondo denso”, que se utiliza en superficies articuladas ya que gracias a esta configuración presenta resistencia la desgate y permite el crecimiento óseo.

En el caso de los bloques circulares dos configuraciones son comúnmente utilizadas para aplicaciones médicas, la primera de ellas es llamada “núcleo denso y capa porosa”, esta configuración esta apta para implantes que requieran una alta resistencia mecánica y crecimiento óseo. La segunda, conocida como “capa menos porosa y núcleo más poroso”, es usualmente utilizada para piezas que van a albergar, transportar y liberar fármacos.

Otro tipo de soporte que es usualmente utilizado en la ingeniería tisular, son los andamios (scaffolds), estos cumplen dos funciones fundamentales, sirven de soporte y se absorben a medida que el nuevo tejido óseo se forma (regeneración del tejido óseo) el cual se va a encarga de la carga mecánica a la que estará sometido. Durante toda esta actividad enzimática, los scaffolds proveen la producción y organización de la matriz celular natural y gracias a que estos poseen una red interconectada porosa (combinación macroporos y microporos), permiten la proliferación celular, diferenciación celular y potencializa la formación de nuevo tejido óseo.

Para obtener scaffolds que cumplan con todas estas funciones, en su proceso de elaboración es necesario tener en cuenta los siguientes parámetros: rugosidad superficial para garantizar la fijación de las células, porosidad alta y con las dimensiones adecuadas que permiten la vascularización del material y resistencia mecánica a la contracción. La Tabla 1, muestra algunos tamaños de poro utilizados para la elaboración de scaffolds y su función [5].

Tabla 1. Función de scaffolds según el tamaño de poro [5]

Tamaño de poro 3D (μm)	Función
< 1	Responsable de la interacción entre partículas y de la bioactividad.
1-20	Orientación y direccionamiento del crecimiento celular.
100-1000	Principal función, la resistencia mecánica, crecimiento óseo, crecimiento celular.
>1000	Funcionalidad del implante, estética del implante.

8. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

La caracterización del material obtenido después de cada etapa de elaboración (síntesis, elaboración de preformas, sinterización, pruebas *in vitro*) de las Hidroxiapatitas carbonatadas es fundamental para evaluar las propiedades morfológicas, características fisicoquímicas del material de partida y su respuesta biológica en medio fisiológico. En los numerales citados a continuación se mostrarán las técnicas utilizadas y su respectiva evaluación.

8.1. Síntesis de Hidroxiapatitas carbonatadas

En la sección 4, se mostró los métodos comúnmente implementados para la síntesis de Hidroxiapatita carbonatada, donde se observó, que cada uno de estos presenta una manera de elaboración diferente, en lo que respecta a la técnica implementada ya sea vía húmeda o seca, los precursores químicos, temperaturas, control de atmósferas, tasa de carbonatación, etc. Es fundamental entonces que después de realizar la síntesis de estos tipos de apatitas, se caracterice el material (ver Tabla 2), ya que el objetivo principal es llegar a obtener una apatita de composición química similar a la apatita natural y con las características físicas y morfológicas requeridas por el material para la siguiente etapa de sinterización.

Tabla 2. Técnicas de caracterización usualmente utilizadas para la etapa de síntesis de Hidroxiapatitas carbonatadas [14]

Técnica caracterización	Evaluación
Difracción de rayos X (DRX)	Análisis las fases presentes en el seno del material, para cada tipo de apatita A, B y AB.
Espectro infrarrojo (IR)	Identificar los grupos funcionales PO_4^{3-} , CO_3^{2-} y OH^- característicos de las HAC y otros grupos susceptibles de estar presentes en la HAC y que no se observan en el DRX.
B.E.T (medida superficie específica)	Conocer este valor es fundamental pues de acuerdo a este se evalúa la habilidad de sinterización del material. Una mayor superficie de contacto da una mejor densificación ($\sim 50\text{m}^2/\text{g}$) [10].
Distribución granulométrica	Monomodal y tamaño de partícula escala nanométrica, dan mayor homogeneidad.
Análisis elemento carbono	Tasa de carbonatación de las HAC. Relación molar ($\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$).

8.2 Sinterización

La sinterización comprende la segunda etapa dentro del proceso de elaboración de apatitas carbonatadas y es la que le da al material las propiedades finales con las que éste contará, para luego proceder con la elaboración de las formas según sea la aplicación prevista, es por esto que una vez finalizada la sinterización, se debe caracterizar el material (ver Tabla 3) para corroborar que éste no haya sufrido ningún tipo de descomposición después del tratamiento térmico, es decir, corroborar que la apatita conserva la composición química obtenida en la etapa de la síntesis y evaluar el efecto que tiene la temperatura sobre los mecanismos de formación de la porosidad y la morfología [42] .

Tabla 3. Técnicas de caracterización usualmente utilizadas para la etapa de sinterización de las Hidroxiapatitas carbonatadas

Técnica caracterización	Evaluación
DRX e IR	Conocer si las apatitas carbonatadas mantienen su composición inicial (monofásica). Después de la sinterización.
MEB	Morfología de las apatitas carbonatadas (crecimiento de grano, consolidación y/o densificación del material).
Densidad (método de Arquímedes) y porosidad.	Efecto del tratamiento térmico en la eliminación de porosidad abierta o cerrada, o ambas, según sea el caso.
Ensayos de compresión, tensión, flexión de acuerdo a la norma	ASTM C1424-04 (compresión)[43]. ASTM C1161-02c (flexión) [44]. ASTM C1273-05 (tensión) [45].

9. CONCLUSIONES

La hidroxiapatita carbonatada, posee propiedades de osteoinducción, osteoconducción, biocompatibilidad y biodegradabilidad lo que la vuelve un material muy llamativo para ser implantado en el cuerpo humano. Estas propiedades se obtendrán siempre y cuando su proceso de elaboración se realice de manera correcta controlando principalmente tres parámetros: temperatura, tasa de carbonatación y presión de gas, ya que estos le darán al material las condiciones finales que poseerá en cuanto a composición química, estructura y morfología.

La combinación de todas estas propiedades hace que la HAC sea considerada para ser utilizada como soporte mecánico y para la funcionalización de ésta por medio de la incorporación de moléculas activas, ya que su estructura y biodegradabilidad permiten que albergue, transporte y

libere de manera controlada dichas moléculas, lo que permite potencializar su uso y aplicación, pues se podría tratar fracturas óseas o enfermedades óseas degenerativas directamente en el lugar de implante sin necesidad de ingerir medicamentos (antibióticos y/o antiinflamatorios) que la mayoría de las veces generan reacciones adversas debidas a las interacciones enzimáticas propias del tracto gastrointestinal. Por este método, se tendría entonces una liberación controlada, prolongada y a concentraciones establecidas de la molécula en el sitio implantado mientras se da todo el proceso normal de regeneración ósea en el cuerpo.

Por último, los diferentes métodos de obtención de apatitas citados en esta revisión nos permiten tener una amplia visión respecto a la aplicación de este tipo de biomateriales en la ingeniería de tejidos, donde se evidencia que es posible potencializar cada vez más su uso obteniéndose así biocerámicos con un mejor diseño y desempeño.

10. REFERENCIAS

- [1] S. V. Dorozhkin, "A detailed history of calcium orthophosphates from 1770s till 1950," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 6, pp. 3085–3110, 2013.
- [2] L. A. González, G. M. Vázquez, and J. F. Molina, "Epidemiología de la osteoporosis," *Rev. Colomb. Reumatol.*, vol. 16, no. 1, pp. 61–75, 2009.
- [3] Z. Zyman and M. Tkachenko, "CO₂ gas-activated sintering of carbonated hydroxyapatites," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 31, no. 3, pp. 241–248, 2011.
- [4] A. M. C. Barradas, H. Yuan, J. van der Stok, B. Le Quang, H. Fernandes, A. Chaterjea, M. C. H. Hogenes, K. Shultz, L. R. Donahue, C. van Blitterswijk, and J. de Boer, "The influence of genetic factors on the osteoinductive potential of calcium phosphate ceramics in mice," *Biomaterials*, vol. 33, no. 23, pp. 5696–5705, 2012.
- [5] S. V. Dorozhkin, "Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics," *Materials (Basel)*, vol. 6, pp. 3840–3942, 2013.
- [6] S. V. Dorozhkin, "Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 3, pp. 963–977, 2012.
- [7] W. R. Moore, S. E. Graves, and G. I. Bain, "Synthetic bone graft substitutes," *ANZ J. Surg.*, vol. 71, no. 6, pp. 354–361, 2001.
- [8] C. Peniche, Y. Solís, N. Davidenko, and R. García, "Materiales compuestos de quitosana e hidroxapatita," *Biotechnol. Apl.*, vol. 27, pp. 192–201, 2010.
- [9] D. Tadic, F. Peters, and M. Epple, "Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites," *Biomaterials*, vol. 23, pp. 2553–2559, 2002.
- [10] E. Champion, "Sintering of calcium phosphate bioceramics," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 4, pp. 5855–5875, 2013.
- [11] E. Landi, G. Celotti, G. Logroscino, and A. Tampieri, "Carbonated hydroxyapatite as bone substitute," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 23, no. 15, pp. 2931–2937, 2003.
- [12] J. P. Lafon, E. Champion, and D. Bernache-Assollant, "Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6-x(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x-2y}(\text{CO}_3)_y$ ceramics with controlled composition," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 28, no. 1, pp. 139–147, 2008.
- [13] F. C. M. Driessens, "The mineral in bone, dentin and tooth enamel," *Bull. des Sociétés Chim. Belges*, vol. 89, no. 8, pp. 663–689, 1980.
- [14] J.-P. Lafon, "Synthese, stabilite thermique et frittage d'hydroxyapatites carbonates," p. 208, 2004.

- [15] J. C. Elliott, *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, vol. 18. 1994.
- [16] S. R. Radin and P. Ducheyne, "The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. II. Precipitation," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 27, no. 1, pp. 35–45, 1993.
- [17] D. G. A. Nelson, "The influence of carbonate on the atomic structure and reactivity of hydroxyapatite," *J. Dent. Res.*, vol. 60, no. 3 suppl, pp. 1621–1629, 1981.
- [18] J. Barralet, M. Akao, and H. Aoki, "Dissolution of dense carbonate apatite subcutaneously implanted in Wistar rats," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 49, no. 2, pp. 176–182, 2000.
- [19] G. Bonel., "Contribution à l'étude de la carbonatation des apatites - 3 - Synthèse et étude des propriétés physico-chimiques d'apatites carbonatée dans deux types de sites. Evolution des spectres IR en fonction de la composition des apatites.," *Ann. Chim.*, p. 7: 140 – 144., 1972.
- [20] M. Vignoles-Montrejaud, "Contribution à l'étude des apatites carbonatées du type B," Institut national polytechnique Toulouse, toulouse, 1984.
- [21] J. Merry., "Preparation and characterisation of carbonate hydroxyapatite," Queen Mary and Westfield college, london, 2000.
- [22] Y. Doi, T. Shibutani, Y. Moriwaki, T. Kajimoto, and Y. Iwayama, "Sintered carbonated apatites as bioresorbable bone substitutes," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 39, p. 603, 1998.
- [23] A. A. Baig, J. L. Fox, R. a. Young, Z. Wang, J. Hsu, W. I. Higuchi, A. Chhetry, H. Zhuang, and M. Otsuka, "Relationships among carbonated apatite solubility, crystallite size, and microstrain parameters," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 64, no. 5, pp. 437–449, 1999.
- [24] C. Carretero, C. Bernal, M. Lucía Torres, K. Jamuna Thevi, C. de Materiales, F. Ayad Zakaria, and J. Mikán, "Evaluación de la biocompatibilidad de apatita carbonatada de síntesis seca por medio del cultivo de células osteoprogenitoras de porcino," *revista*, vol. 17, no. 2, pp. 231–244, 2009.
- [25] J. C. Labarthe and G. Bonel., "Sur la structure et les propriétés des apatites carbonatées de type B phospho-calciques.," *Ann. Chim.*, vol. 8, pp. 289 – 301., 1973.
- [26] R. Legros, N. Balmain, and E. Al., "Structure and composition of the mineral phase of periosteal bone.," *J. Chem. Res.*, p. S: 8 – 9., 1986.
- [27] D. W. Holcomb and R. A. Young, "Thermal Decomposition of Human Tooth Enamel," *Calcif. Tissue Int*, vol. 31, pp. 189–201, 1980.
- [28] A. V. Burgess, B. J. Story, D. La, W. R. Wagner, and J. P. LeGeros, "Highly crystalline MP-1 hydroxylapatite coating Part I: In vitro characterization and comparison to other plasma-sprayed hydroxylapatite coatings," *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 10, no. 4, pp. 245–256, 1999.
- [29] I. R. Gibson and W. Bonfield, "Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 59, no. 4, pp. 697–708, 2002.
- [30] R. Z. Legeros, "crystallography studies of the carbonate substitution in the apatite structure," university new york, 1979.
- [31] C. Vignoles., "Contribution à l'étude de l'influence des ions alcalins sur la carbonatation dans les sites de type B des apatites phospho-calciques," 1973.
- [32] S. Raynaud, E. Champion, J. P. Lafon, and D. Bernache-Assollant, "Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio III. Mechanical properties and degradation in solution of hot pressed ceramics," *Biomaterials*, vol. 23, pp. 1081–1089, 2002.

- [33] J. E. Barralet, "Processing and sintering of carbonate hydroxyapatite," London, 1995.
- [34] Y. Suetsugu and J. Tanaka, "crystal growth of carbonate apatite using a CaCO₃ flux," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 10, pp. 561–566, 1999.
- [35] L. G. Ellies, D. G. Nelson, and J. D. Featherstone, "Crystallographic structure and surface morphology of sintered carbonated apatites.," *Journal of biomedical materials research*, vol. 22, pp. 541–553, 1988.
- [36] Y. Doi, T. Koda, M. Adachi, N. Wakamatsu, T. Goto, H. Kamemizu, Y. Moriwaki, and Y. Suwa, "Pyrolysis-gas chromatography of carbonate apatites used for sintering," in *Journal of Biomedical Materials Research*, 1995, vol. 29, no. 11, pp. 1451–1457.
- [37] P.V. Riboud, "Composition et stabilité des phases à structure d'apatite dans le système CaO-P₂O₅-Oxyde de fer-H₂O à haute température.," *Ann. Chim.*, p. Fr. 8: 381–390., 1973.
- [38] J. Lafon, E. Champion, and D. Bernache Assollant, "Thermal behaviour of synthetic carbonate hydroxyapatite in various atmospheres: experimental approach and thermodynamical modelling, in preparation," 2007.
- [39] A. R. Studart, U. T. Gonzenbach, E. Tervoort, and L. J. Gauckler, "Processing routes to macroporous ceramics: A review," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 89, no. 6, pp. 1771–1789, 2006.
- [40] N. M. Pareja, D. M. Escobar, C. P. Ossa, and A. Echavarría, "Síntesis y caracterización de hidroxiapatita microporosa, comparación con un producto comercial," *Rev. Fac. Ing.*, no. 43, pp. 67–76, 2008.
- [41] M. Espanol, R. a. Perez, E. B. Montufar, C. Marichal, A. Sacco, and M. P. Ginebra, "Intrinsic porosity of calcium phosphate cements and its significance for drug delivery and tissue engineering applications," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 7, pp. 2752–2762, 2009.
- [42] G. Bonel., "Contribution à l'étude de la carbonatation des apatites - 1- Synthèse et étude des propriétés physico-chimiques des apatites carbonatées du type A.," *Ann. Chim.*, vol. 7, pp. 65–88, 1972.
- [43] "ASTM C1424-04, "Standard Test Method for Monotonic Compressive Strength of Advanced Ceramics at Ambient Temperature." .
- [44] "ASTM C1161-02c, 'Standard Test Method for Flexural Strength of Advanced Ceramics at Ambient Temperature.'" .
- [45] "ASTM C1273-05, 'Standard Test Method for Tensile Strength of Monolithic Advanced Ceramics at Ambient Temperatures.'" .