



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ**

**EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE HIDROXIAPATITA DE FÉMUR DE BOVINO POR FLUIDOS
SUPER Y SUBCRÍTICOS**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

P R E S E N T A:

I.A.Q. Lucía Yazmín Muñoz Castillo

ASESORES:

Dr. Andrés Antonio Acosta Osorio

Dra. Guadalupe del Carmen Rodríguez Jimenes

Dr. Felipe Antonio Perdomo Hurtado (UJTL)

H. VERACRUZ, VER. MÉXICO.

JUNIO 2018

EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROXIAPATITA DE
FÉMUR DE BOVINO POR FLUIDOS SUPER Y SUBCRITICOS

Por:

Lucía Yazmín Muñoz Castillo

Tesis propuesta a la

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN ALIMENTOS DEL INSTITUTO
TECNOLOGICO DE VERACRUZ

Como requerimiento parcial para obtener el grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS EN
INGENIERIA BIOQUIMICA

JUNIO 201

RESUMEN

Muñoz Castillo Lucía Yazmín. M. en C. en ingeniería bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio 2018. “Extracción, purificación y caracterización de hidroxapatita de fémur de bovino por fluidos super y subcríticos”. Asesores: Dr. Andrés Acosta Osorio, Dra. Guadalupe del Carmen Rodríguez Jimenes, Dr. Felipe Antonio Perdomo Hurtado.

La Hidroxapatita (Hap) es un mineral empleado como biocerámica en el área de la ingeniería de tejidos, ya que presenta una buena compatibilidad, osteointegración y no es tóxico en el huésped. Esta cerámica ha sido sintetizada a través de diferentes rutas químicas. Sin embargo estos procesos pueden ser complicados o inseguros para el medio biológico, es por ello que recientemente se ha obtenido Hap a partir de bio-residuos, como los huesos de bovinos, cerdos, escamas y huesos de pescado. Esta alternativa representa ventajas económicas y ambientales. La purificación de Hap involucra la separación de lípidos y proteínas del tejido óseo con métodos enzimáticos, alcalinos y uso de disolventes; alcanzando altas temperaturas (entre 300 y 1000 °C) y tiempos prolongados (mayores a 12 h). La tecnología de fluidos supercríticos ha demostrado ser eficaz para la extracción de macromoléculas. En este trabajo se propuso purificar Hap mediante fluidos subcríticos y supercríticos a partir de hueso de fémur bovino, porque presenta similitud con el tejido óseo humano. El hueso de fémur bovino está compuesto de 2.46% de lípidos, 27.5% de proteína, 5.32% de agua y 64.73% de minerales. Para la extracción de los lípidos se realizó un diseño experimental 3^2 usando CO_2 supercrítico como disolvente y etanol como co-solvente, el ANOVA y la prueba Tukey mostró que hay un efecto significativo en la temperatura respecto a la extracción de los lípidos. Los resultados obtenidos de los diferentes ensayos en la extracción supercrítica demostraron que el CO_2 SC extrajo 1.97 g de grasa/100 g de muestra en condiciones de $T = 120^\circ\text{C}$ y $P = 2.5 \times 10^7$ Pa en un tiempo de 60 min; a diferencia del CO_2 SC y Etanol que extrajo

2.45 g de grasa / 100 g de muestra en las mismas condiciones de presión y temperatura, pero en un tiempo de 20 min usando un flujo de etanol de 8 ml/min. Para purificar la hidroxiapatita se extrajo la proteína con agua en condiciones subcríticas. A partir del análisis termogravimétricos se observó que con el tratamiento a 150 °C y 4×10^7 Pa durante 60 min, se obtuvo un 95 % de Hap. Adicionalmente, se realizó el estudio de difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido (BET) en la Unidad de Investigación y desarrollo de alimentos UNIDA, con la finalidad de observar cualitativamente cambios en la estructura cristalina y en la morfología del mineral obtenido. Los estudios realizados permitieron obtener difractogramas, termogramas y micrografías de las diferentes muestras analizadas y confirmaron que se logró purificar un 95% del mineral usando fluidos supercríticos, subcríticos y cosolventes. De este trabajo se concluye que se purificó la Hap, usando agua-etanol-CO₂ como disolvente así como bajas temperaturas y tiempos cortos para la purificación de éste mineral.

ABSTRACT

Muñoz Castillo Lucía Yazmín. M. en C. en ingeniería bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio 2018. "Extraction, purification and characterization of hydroxyapatite of bovine femur by super and subcritical fluids". Asesores: Dr. Andrés Acosta Osorio, Dra. Guadalupe del Carmen Rodríguez Jimenes, Dr. Felipe Antonio Perdomo Hurtado.

Hydroxyapatite (Hap) is a mineral used as a bioceramic in the area of tissue engineering, since it has a good compatibility, osseointegration and is not toxic in the host. This ceramic has been synthesized through different chemical routes. However, these processes can be complicated or unsafe for the biological environment, which is why Hap has recently been obtained from bio-residues, such as the bones of bovines, pigs, scales and fish bones. This alternative represents economic and environmental advantages. The purification of Hap involves the separation of lipids and proteins from bone tissue with enzymatic, alkaline methods and the use of solvents; reaching high temperatures (between 300 and 1000 ° C) and long times (greater than 12 h). The technology of supercritical fluids has proven to be effective for the extraction of macromolecules. In this work, it was proposed to purify Hap by subcritical and supercritical fluids from bovine femur bone, because it is similar to human bone tissue. Bovine femur bone is composed of 2.46% lipids, 27.5% protein, 5.32% water and 64.73% minerals. For the extraction of the lipids, an experimental design 32 was made using supercritical CO₂ as solvent and ethanol as co-solvent, the ANOVA and the Tukey test showed that there is a significant effect on the temperature with respect to the extraction of the lipids. The results obtained from the different tests in the supercritical extraction showed that the SC CO₂ extracted 1.97 g of fat / 100 g of sample under conditions of T = 120 ° C and P = 2.5 × 10⁷ Pa in a time

of 60 min; unlike the SC CO₂ and ethanol that extracted 2.45 g of fat / 100 g of sample under the same conditions of pressure and temperature, but in a time of 20 min using an ethanol flow of 8 ml / min. To purify Hydroxyapatite, the protein was extracted with water under subcritical conditions. From the thermogravimetric analysis it was observed that with the treatment at 150 ° C and 4×10^7 Pa for 60 min, 95% Hap was obtained. Additionally, the study of X-ray diffraction and scanning electron microscopy (SEM) was carried out in the UNIDA food research and development unit, with the aim of qualitatively observing changes in the crystalline structure and in the morphology of the mineral obtained. The studies carried out obtained diffractograms, thermograms and micrographs of the different samples analyzed and confirmed that 95% of the mineral was purified using supercritical, subcritical and cosolvent fluids. From this work it is concluded that the Hap was purified, using water-ethanol-CO₂ as solvent as well as low temperatures and short times for the purification of this mineral.

CONTENIDO

DEDICATORIAS	i
RECONOCIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Biomateriales	3
2.2 Hidroxiapatita	6
2.2.1 Biocompatibilidad	7
2.2.2 Biomineralización	8
2.2.3 Comportamiento de la hidroxiapatita como biomaterial	10
2.2.4 Obtención de la hidroxiapatita	12
2.2.5 Técnicas de caracterización de la hidroxiapatita	13
2.2 Extracción por fluidos supercríticos	16
2.3 Propiedades de los fluidos supercríticos	19
2.4 Extracción de proteína con H ₂ O subcrítica	20
2.5 Extracción de lípidos con fluidos supercríticos	22
2.6 Aplicaciones de los fluidos supercríticos	23
3 SINTESIS DE ANTECEDENTES	23

4	OBJETIVOS	24
4.1	OBJETIVO GENERAL	24
4.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	24
5	MATERIALES Y METODOS	25
5.1	Descripción general.....	25
5.2	Preparación de la muestra	26
5.3	Caracterización de los polvos de hueso.....	27
5.3.1	Determinación de humedad.....	27
5.3.2	Determinación de humedad y cenizas por medio de análisis térmico....	27
5.3.3	Determinación de proteínas.....	28
5.3.4	Determinación de grasas por método de Soxhlet.....	28
5.3.5	Análisis por cromatografía de gases.	28
5.3.6	Distribución de tamaño de partícula.	29
5.4	Extracción con fluidos supercríticos	29
5.4.1	Extracción con CO ₂ SC y etanol.....	30
5.4.2	Extracción con CO ₂ SC y H ₂ O subcritica.....	30
5.5	Caracterización de los polvos obtenidos.....	31
5.5.1	Análisis térmico:.....	31
5.5.2	Difracción de rayos X:.....	32
5.5.3	Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	32
5.5.4	Microscopio electrónico de barrido	32
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1	Caracterización de los polvos de hueso de bovino	33

6.1.1	Determinación de humedad.....	33
6.1.2	Determinación de la materia orgánica	34
6.1.3	Distribución de tamaño de partícula	35
6.2	Extracción de lípidos con CO ₂ -sc y Etanol.....	36
6.3	Extracción de proteína con CO ₂ -sc y H ₂ O-subcrítica.....	38
6.4	Caracterización de los polvos obtenidos	40
6.4.1	Determinación del contenido de mineral por análisis térmico	40
6.4.2	Fases cristalinas.....	42
6.4.3	Morfología de los polvos de hueso de bovino y los polvos de hidroxiapatita.	43
6.4.4	Identificación de los grupos funcionales.....	45
7	CONCLUSIONES	48
8	BIBLIOGRAFIA	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1:	Materiales sintéticos y naturales modificados, aplicados en medicina	4
Tabla 2.2:	Clasificación de métodos de obtención de hidroxiapatita sintética y biogénica	12
Tabla 2.3:	Temperatura crítica (Tc), presión crítica (Pc) y densidad crítica (ρ_c) de algunos fluidos	18
Tabla 2.4:	Algunas aplicaciones de los Fluidos Supercríticos	23
Tabla 5.1:	Nombre de las muestras seleccionadas de los mejores tratamientos de la extracción supercrítica.	31
Tabla 6.1:	Perfil de ácido grasos	34
Tabla 6.2:	Resultados del análisis de la distribución de partícula	35
Tabla 6.3:	Porcentaje de lípidos extraídos a diferentes condiciones de presión y temperatura	36
Tabla 6.4	Porcentaje de mineral presente en los polvos obtenidos después de la extracción con CO ₂ y agua a diferentes concentraciones de presión y temperatura	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1:	Composición micrométrica y manométrica de un hueso	6
Figura 2.2	Diagramas de fases de un compuesto puro	17
Figura 5.1	Metodología general de la purificación de hidroxiapatita a partir de hueso de bovino	25
Figura 5.2	Fémur de bovino limpio	26
Figura 5.3	Rodajas del hueso cortical de fémur de bovino	26
Figura 5.4	Trozos de hueso de fémur de bovino	26
Figura 5.5	Polvos de hueso	26
Figura 6.1	Termograma de hueso de bovino	33
Figura 6.2	Distribución de tamaño de partícula del hueso de bovino	36
Figura 6.3	Efecto de la presión y temperatura sobre la extracción de grasa en el hueso después de tratamiento con CO ₂ y Etanol en condiciones supercríticas	37
Figura 6.4	Cinética de extracción a) Tratamiento a 0.4 mL/min, b) Tratamiento 8 mL/min	38
Figura 6.5	Efecto de la presión y temperatura respecto mineral presente en los polvos de hueso tratados con CO ₂ - SC y H ₂ O-sub	39
Figura 6.6	Termograma de los polvos tratados con CO ₂ -sc y H ₂ O-sub a 150°C y 400 bar	41
Figura 6.7	Difractogramas del hueso de bovino y de los polvos después de la extracción sub y supercrítica	42
Figura 6.8	Micrografías de polvos: a) Hueso de bovino, b) Hueso de bovino sin grasa, c) hidroxiapatita	44
Figura 6.9	Micrografías de: a) Hueso de bovino, b) Hueso desengrasado (Soxhlet), c) Hueso desengrasado (FSC)	44
Figura 6.10	Micrografías de polvos de Hap.: a) Extracción discontinua, b) Extracción continua	45
Figura 6.11	Espectro IR de hueso de bovino	46

Figura 6.12	Espectro IR de muestra desengrasada por método Soxhlet	46
Figura 6.13	Espectro IR de muestra desengrasada por Extracción supercrítica	46
Figura 6.14	Espectro IR Polvos de hidroxiapatita (Tratamiento discontinuo)	46
Figura 6.15	Espectro IR de Polvos de hidroxiapatita (Tratamiento continuo)	47

1 INTRODUCCIÓN

Existe un gran interés en desarrollar nuevos biomateriales funcionales capaces de estimular una respuesta biológica necesaria para reestablecer las funciones de un tejido dañado. La creciente demanda de biomateriales con propiedades específicas concebidos para la aplicación deseada, ha conducido al desarrollo de nuevas rutas sintéticas de composites con aplicaciones en la medicina regenerativa de tejidos mineralizados como el hueso. La hidroxiapatita es una cerámica biocompatible que puede ser de origen natural o sintético; siendo la cerámica más ampliamente utilizada en el campo de los biomateriales e ingeniería de tejido óseo. Éste biomaterial es de gran interés debido a su excelente biocompatibilidad y un alto potencial osteogénico; promoviendo el crecimiento óseo a través de la osteoconducción sin causar ninguna toxicidad local o sistémica, inflamación o respuesta de cuerpos extraños (O'Hare *et al.*, 2010).

Se han estudiado diferentes métodos de obtención de la biohidroxiapatita a partir de residuos orgánicos como: huesos de pescado (Ozawa y Suzuki, 2002), huesos bovino (Joschek *et al.*, 2000; Giraldo-betancur *et al.*, 2013), huesos de cerdo (Xiaoying *et al.*, 2007; Orozco Cardona *et al.*, 2013). La mayoría de los métodos empleados son: calcinación y tratamientos enzimáticos, los cuales involucran periodos largos de tiempo y un alto consumo de energía; también se ha empleado el uso de solventes para eliminar la presencia de lípidos en el hueso; por lo que resulta preocupante para el uso en las biocerámicas.

Uno de los solventes más usados en las extracciones con fluidos supercríticos es el CO₂ supercrítico; debido a que no es tóxico, inflamable, no corrosivo, incoloro, no es costoso, se elimina fácilmente, no deja residuos, sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar y se consigue con

diferentes grados de pureza, se puede trabajar a baja temperatura y por tanto, se pueden separar compuestos termolábiles.

Por tal motivo este trabajo se realizó con el objetivo de reducir tiempo, solventes y energía, además de aportar la eficiencia de la tecnología de extracción con fluidos supercríticos, la cual ha abierto nuevas perspectivas para la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y agroindustrial; ya que tiene la capacidad de extraer ciertos compuestos químicos con el uso de solventes específicos bajo la combinación de temperatura y presión (Brunner, 1994).

En este proyecto se utilizó etanol como cosolvente para la remoción de la grasa de la matriz ósea y CO₂ supercrítico por su eficiente difusión en sólidos micro porosos y por tener una buena capacidad para disolver lípidos. Además se utilizó agua subcrítica de baja polaridad presurizada (PLPW) para extraer las proteínas de la matriz ósea, empleando temperaturas de trabajo de valor crítico del agua (379 °C) pero superior a 100 °C. Esta purificación empleando CO₂ SC, es el primer paso ideal de cualquier procesamiento óseo, porque la porosidad del tejido óseo se vuelve mucho más accesible, lo que puede aumentar la ósteo conducción una vez implantado. En este sentido, Fages *et al.* (1994), afirman que es un proceso seguro ya que no implica ningún producto químico tóxico y es potencialmente utilizable con aloinjertos (hueso de la misma especie) así como xenoinjertos (hueso de otra especie).

2 ANTECEDENTES

2.1 Biomateriales

Son materiales capaces de estar en contacto con tejidos vivos, durante un periodo de tiempo, como parte del mismo, con la finalidad de completarlo y/o de ayudar a mejorar el funcionamiento de este cuando forma parte de un sistema, no tóxico, sin afectar al resto del organismo, (Piña, 2007). La segunda guerra mundial fue el punto de partida para desarrollo de nuevos biomateriales y procesos, ante la necesidad de rehabilitar y mejorar la calidad de vida de los heridos en combate. Entre los éxitos con más trascendencia en este periodo histórico se encuentra el adelanto de los implantes intraoculares de polimetilmetacrilato y el establecimiento de la ciencia de los materiales, por el trabajo conjunto que se desarrollan en la medicina (Garzón *et al.*, 2013).

Debido a que los biomateriales restauran funciones de tejidos vivos y órganos en el cuerpo, es esencial entender las relaciones existentes entre las propiedades, funciones y estructuras de los materiales biológicos, por este motivo se estudian bajo tres aspectos fundamentales: materiales biológicos, materiales de implante y la interacción existente entre ellos dentro del cuerpo. En la tabla 2.1, se enlistan alguna de las aplicaciones de materiales sintéticos y biomateriales que son implantados en el cuerpo; entre ellos se encuentran: cerámicas, polímeros y compositos que son usados como molde o en partes mecánicas, recubrimientos, fibras, biopelículas, espumas y tejidos. Resulta bastante complicado encontrar un material biocompatible que combine excelentes propiedades mecánicas adaptables al organismo, tales como resistencia, módulo elástico, dureza, buena resistencia a la fatiga de acuerdo al tiempo de vida (Rodil, 2009), junto con características superficiales biocompatibles.

Tabla 2.1: Materiales sintéticos y naturales modificados, aplicados en medicina

	Aplicación	Tipo de material
Sistema óseo	Remplazos articulares (Cadera, rodilla)	Titanio, aleaciones de Ti-Al-V, acero inoxidable y polietileno.
	Placa ósea para fijación de fractura	Acero inoxidable, aleaciones de Co-Cr
	Cemento óseo	Poli (metil-metacrilato)
	Reparación de defecto óseo	hidroxiapatita
	Tendón y ligamento artificial	Teflón, dacron
	Implantes dentales para fijación de dientes	Titanio, aleaciones de Ti-Al-V, acero inoxidable, Polietileno, alúmina y fosfatos de calcio.
Sistema cardiovascular	Prótesis de vasos sanguíneos	Dacron, teflón, Poliuretano
	Válvulas de corazón	Tejido procesado, acero inoxidable, carbón
	Catéter	Goma de silicona, teflón, Poliuretano.
Órganos	Corazón artificial	Poliuretano
	Plantillas de reparación de piel	Silicona- compositos de colágeno
	Riñón artificial (hemodiálisis)	Celulosa, Poliacrilonitrilo
	Maquina corazón-pulmón	Goma de silicona
Sentidos	Reemplazo coclear	Electrodos de platino
	Lente intraocular	Polimetilmetacrilato), goma de silicona, hidrogel
	Lentes de contacto	Silicina-acrilato, hidrogel
	Vendaje corneal	Colágeno, hidrogel

Debido a esto, durante las últimas dos décadas se ha acelerado y expandido el desarrollo de diferentes técnicas de modificación superficial de materiales biocompatibles que no sean tóxicos para el organismo y que, a su vez,

propicien el crecimiento celular (biofuncionales). De esta manera, es posible hacer biomateriales ideales con atributos superficiales que reaccionen adecuadamente con los tejidos del huésped, además de tener como valor agregado sustituir las aleaciones de alto costo, como las de titanio y CrCo, con recubrimientos en forma de películas delgadas más estables y económicas según (Lopez *et al.*, 2004).

Cuando los biomateriales se insertan en el cuerpo humano, sus superficies entran en contacto con el tejido huésped o con los fluidos corporales induciendo una variedad de respuestas biológicas tales como la adsorción de proteínas, la formación de trombos e inflamación; determinadas en gran parte, como se mencionó anteriormente, por las propiedades superficiales de los materiales. Kang y Lee (2012) mencionan que en consecuencia, una respuesta biológica desfavorable puede reducir con rapidez el desempeño esperado de un biomaterial o causar efectos secundarios graves, modificando las superficies de los materiales biocompatibles. El éxito de un biomaterial o de un implante depende de cuatro factores principales: propiedades, biocompatibilidad del implante, condiciones de salud del receptor, y habilidad del cirujano que realiza el implante. Según Gallegos (2013) describen los requisitos que debe cumplir un biomaterial son:

- 1) Ser biocompatible, es decir, debe ser aceptado por el organismo, no provocar que éste desarrolle sistemas de rechazo ante la presencia del biomaterial
- 2) No ser tóxico, ni carcinógeno.
- 3) Ser químicamente estable (no presentar degradación en el tiempo) e inerte.
- 4) Poseer una resistencia mecánica adecuada.
- 5) Tiempo de fatiga adecuado.
- 6) Densidad y peso adecuados.
- 7) Tener un diseño de ingeniería perfecto; esto es, el tamaño y la forma del implante deben ser los adecuados.

- 8) Ser relativamente barato, reproducible y fácil de fabricar y procesar para su producción en gran escala.

2.2 Hidroxiapatita

El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que está estructurado en laminillas de matriz osteoide (orgánica) calcificada la cual presenta un tercio del peso óseo. La figura 2.1, muestra como la matriz orgánica está formada fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca el colágeno tipo 1 y proteínas no colágenas. Fernandez *et al.* (2006) definen que el componente mineral del hueso está formado por calcio, fosfato y carbonato (en proporciones de 10:6:1) en forma de cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y en menor proporción se encuentra magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor.

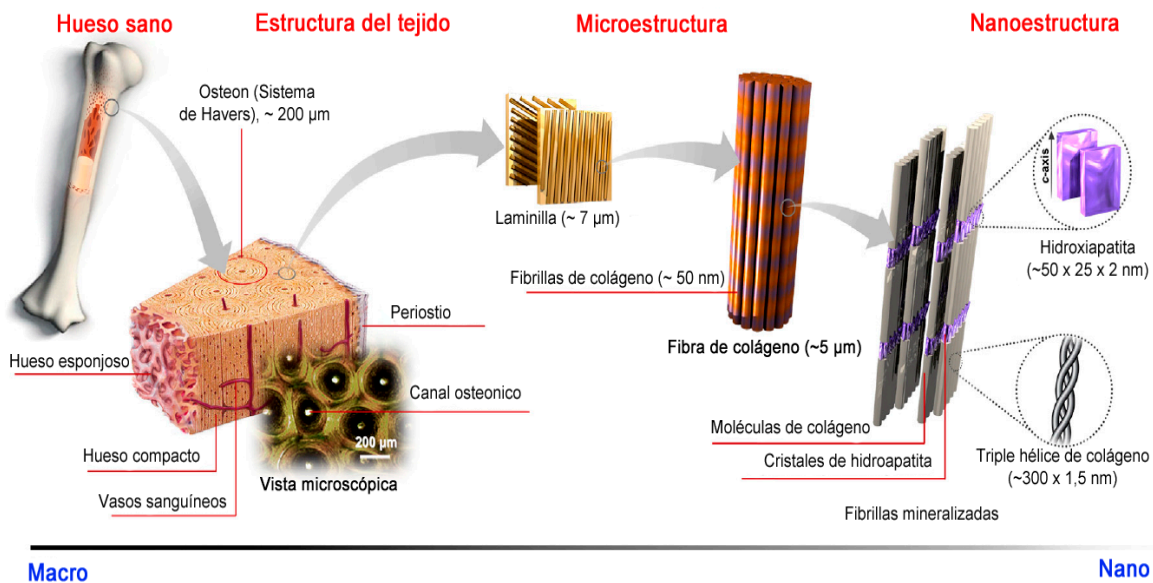


Figura 2.1: Composición micrométrica y nanométrica de un hueso. (Sadat-Shojai *et al.*, 2013)

La hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), es el fosfato de calcio natural más abundante en la superficie terrestre y la principal fuente de fósforo por lo que es de

gran importancia en aplicaciones biomédicas para la reparación de los tejidos óseos (Jensen *et al.*, 2012); por su capacidad de unirse directamente al tejido óseo del huésped debido a su similitud con la composición química del hueso natural y por sus propiedades mecánicas totales del hueso (Rho *et al.*, 1998). Sin embargo el uso de la hidroxiapatita se ha restringido a ser aplicada en ciertos defectos óseos (H. Wang *et al.*, 2007). Por tal motivo la hidroxiapatita ha sido sintetizada a nivel de nanopartículas para mostrar una mayor capacidad de absorción de proteínas. Además se ha introducido una hidroxiapatita nanocristalina recién desarrollada para procedimientos de regeneración en defectos óseos. El desarrollo de este nanomaterial en comparación con los micromateriales; es que, tiene una excelente adhesión con los tejidos circundantes, características de biodegradación rápida y la absorción de biomoléculas en la superficie.

2.2.1 Biocompatibilidad

La similitud química y estructural de la hidroxiapatita con el mineral del hueso sugiere una biocompatibilidad intrínseca actuando como promotora del crecimiento óseo. La estructura y la composición química de la hidroxiapatita puede presentar numerosas sustituciones incluyendo cationes metálicos tales como K^+ , Na^+ , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} entre otros en la posición del Ca^{2+} y complejos aniónicos como AsO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} o SiO_4^{4-} reemplazando al PO_4^{3-} en la red cristalina. Estas sustituciones se encuentran en la naturaleza en forma de trazas, pero para ciertos iones se han observado sustituciones completas. Últimamente se ha comenzado a dirigir el interés hacia el estudio de hidroxiapatitas modificadas involucrando especies que se encuentran en trazas en el organismo ya que estas sustituciones pueden modificar sus propiedades mecánicas y solubilidad así como también su capacidad de unirse al hueso. (Orlovskii *et al.*, 2002; Ogawa y Plepis, 2004; Wahl y Czernuszka, 2006).

Según Fernigrini *et al.* (2008) el método de síntesis puede generar también subproductos tales como CaO (altamente tóxico) o fases de hidroxiapatita carbonatada (sustitución de CO_3^{2-} por PO_4^{3-}) que se encuentra presente en precipitaciones biomiméticas y pueden generar distorsiones en la red cristalina modificando la solubilidad y el tamaño de cristales aun cuando este efecto no siempre es indeseable.

2.2.2 Biomineralización

Se han realizado estudios que han definido la biomineralización como un proceso que conllevan los organismos para la nucleación y crecimiento de cristales, tal como la formación de depósitos minerales o sólidos inorgánicos. Boskey, (2003) señala que en este proceso, las células conducen a formar minerales mediante la expresión de proteínas que tienen como función la nucleación en la célula o en la matriz extracelular, así como impedir la formación de minerales en lugares no deseados.

Se conoce que estructuralmente los biominerales son 80 % cristalinos y 20 % amorfos. Por otra parte, el calcio constituye cerca del 50 % de todo el biomineral conocido. Un 25 % se atribuye a fosfatos. Además, el grupo hidroxilo está presente en un 60 %, generalmente en compuestos de calcio, hierro o silicio. Por otro lado, la dureza en los biominerales obedece al tipo de material y a su grado de mineralización.

En ellos también están presentes organismos biológicos que controlan la biomineralización. En los huesos, los procesos de biomineralización se dan en la matriz extracelular producida por los osteoblastos, siendo estos mismos los que mineralizan la matriz. La matriz extracelular se compone en un 70 a 90 % de

material inorgánico compuesto de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) y otros fosfatos de calcio.

El calcio es un elemento con gran relevancia, no sólo para la estructura y el funcionamiento posterior de los tejidos mineralizados, sino también acompañando la función integral de los individuos. Es un elemento esencial para que los individuos vivan y tengan excitabilidad nerviosa, contracciones musculares, paso de sustancias a través de sus membranas, y actividad hormonal. En los humanos el calcio ocupa el quinto lugar en importancia de los elementos que lo componen, atrás del sodio y del potasio, y es el tercer catión más importante en el espacio extracelular. El 99% del calcio en humanos se haya en huesos y dientes como parte de la hidroxiapatita y el 1% se encuentra en el líquido extracelular (Tresguerres, 2005). La constancia del calcio extracelular está regulada de manera muy precisa, ya que presenta un papel clave en muchos procesos fisiológicos: por ejemplo, si aumenta por arriba de sus valores normales se da lugar a una depresión progresiva del sistema nervioso y la disminución del calcio sistémico da lugar a la tetania (García-Garduño *et al.*, 2006). El calcio, por su tamaño y radio atómico, es el catión más importante en el líquido extracelular para mantener la constancia homeostática de los individuos así como para el transporte de sustancias, bombas metabólicas, actividades excitables y mecánicas en nervios y músculos, es importante remarcar que sin calcio no se efectuarían estas actividades. El metabolismo del calcio es complicado. La acción de los rayos ultravioleta sobre la piel acciona la síntesis de la vitamina D, conjuntamente con el funcionamiento del hígado, intestino y riñón, con el delicado control endocrino de las glándulas tiroides y paratiroides. Todos estos sistemas son dinámicos, presentan una remodelación constante, el hueso viejo es digerido y el hueso nuevo se sintetiza con una acción combinada de los osteoclastos y los osteoblastos. Lo mismo ocurre en el esmalte y la dentina, pero en este caso se llaman odontoclastos y osteoclastos, por lo que concluimos que la conservación de forma y función ósea y dental son totalmente dinámicas, interviniendo hormonas como la somatotrofina u hormona del crecimiento (Tresguerres, 2005).

En el caso del fósforo, para los tejidos mineralizados tiene una regulación estricta. En las células, el fósforo participa en una gran cantidad de funciones, ya que forman parte de la estructura del ATP, almacenan y transducen la energía química mediante la fosforilación y la desfosforilación de proteínas. También los fosfatos forman parte del ADN y el ARN, por lo que son indispensables para la transmisión y codificación genética. Forman parte del AMPc que es un segundo mensajero indispensable para la formación de hormonas.

Los estudios de biomineralización de (Boskey, 2003) en sistemas *in vitro* son desarrollados con el fin de analizar la integración de los osteoblastos, la secreción de la matriz extracelular (ECM) y la precipitación de la hidroxiapatita. De otra manera, los estudios *in vivo* han sido muy valiosos al demostrar que la óseo-integración está influenciada por factores como la locación anatómica, el tamaño del implante, superficie y diseño del implante, procedimientos quirúrgicos, cargas en el material, cambios en el material como respuesta a fluidos biológicos, edad, sexo y tipo de animal.

Para entender el mecanismo de la óseo-integración, los investigadores han desarrollado sistemas *in vitro* de células/implante. En el pasado, la mayoría de dichos estudios describen la respuesta inicial de las células frente a los materiales usados para implantes, mas no cómo se comportan los osteoblastos frente a la superficie del implante y mucho menos el efecto que tiene el tiempo sobre dicha relación. Ahmad *et al.* (1999) desarrollaron un procedimiento que se ha empleado de manera muy similar para los estudios de biomineralización sobre recubrimientos contemporáneos, en superficies de Ti-6Al-4V (ASTM F-136) y Co-Cr-Mo (ASTM F-75).

2.2.3 Comportamiento de la hidroxiapatita como biomaterial

La hidroxiapatita es un cristal biocompatible que ha incursionado en la biomedicina como restaurador, se utiliza en ortopedia, odontología y en oftalmología, en ortopedia ha dado excelentes resultados la hidroxiapatita bovina, porcina, y humana. Se han probado también precursores como los fosfatos y carbonatos de calcio sobre todo en la práctica odontológica. Governa *et al.* (2003) describen que este nanomaterial es biocompatible con los tejidos y destaca que es necesaria la investigación de los métodos de obtención, su combinación con otros elementos y/o compuestos, y conocer la respuesta que tendrá al ser insertada en el huésped.

La hidroxiapatita de diferentes orígenes (bovina, porcina, sintética, coralina, etc.) no se puede utilizar en todo tipo de restauración, ni en las diferentes edades, ya que cambia la respuesta fisiológica ante la dinámica de respuesta en los diferentes sujetos. Governa *et al.* (2003) señala que la hidroxiapatita de coralina no es un buen material en odontología, sin embargo es útil en oftalmología. También da buenos resultados en prótesis oculares con movimientos conjugados. La hidroxiapatita de bovinos es útil para reparaciones óseas, aunque no da buenos resultados como rellenos dentales.

Sin embargo, se deben considerar aspectos físicos y químicos importantes del comportamiento de la hidroxiapatita en su aplicación como biomaterial, tales como resistencia, dureza, porosidad, disolución, adhesividad, etc. No se debe dejar de lado la versatilidad ósea o la intención de su utilización, ya que el medio donde se va a colocar presenta características específicas, considerando que no es lo mismo la utilización como relleno, como soporte o como sustituto. Es difícil actualmente pensar elaborar un órgano dentario completo o la totalidad de un hueso por la gran complejidad de estos sistemas en cuanto a su vascularización, inervación e interacción homeostática tanto con el sistema glandular como con el sistema nervioso, aunque la genómica ofrece perspectivas que pueden llegar a la

reparación del hombre por sí mismo utilizando sus propias células madre (Karsenty, 1999; Governa *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003).

2.2.4 Obtención de la hidroxiapatita

Durante la última década, se han desarrollado diversas rutas sintéticas para la obtención de nanopartículas de hidroxiapatita que satisfagan las características fisicoquímicas necesarias para sus diferentes aplicaciones en la biomédica. Varios investigadores han aportado diferentes métodos químicos de obtención de la hidroxiapatita; por ejemplo, Orlovskii *et al.* (2002) publicaron tres métodos de síntesis de hidroxiapatita: precipitación química, síntesis de estado sólido y método hidrotérmico. El método hidrotérmico también fue usado por (Ferraz *et al.*, 2004; Norton *et al.*, 2006). También se han realizado estudios del comportamiento que tiene este mineral al ser insertado, como es el caso de Doremus, (1992) que publicó sobre el procesamiento y las propiedades mecánicas de la biocerámicas. Wang y Nancollas, (2008), aportaron parámetros importantes en relación a la migración de las células osteoblasticas y la importancia de la relación de las fases de Ca y P.

Tabla 2.2: Clasificación de métodos de obtención de hidroxiapatita sintética y biogénica

Métodos sintéticos	Seco	Síntesis en estados sólido
		Mecánico-químico
	Húmedo	Precipitación química convencional
		Hidrólisis
		Sol-Gel
		Hidrotérmico
		Emulsión
		Sonoquímico
	Proceso de alta temperatura	Combustión
		Pirólisis
Método	Fuentes biogénicas (Porcino, bovino, residuos de pescado y	

natural	cáscara de hueso)
---------	-------------------

Los polvos de hidroxiapatita pueden prepararse químicamente por vía húmeda de estado sólido y por tratamiento hidrotérmico; la técnica empleada en la preparación tendrá un efecto en la morfología del polvo, superficie específica, estequiometría y cristalinidad. Los procedimientos por vía húmeda; involucran la precipitación de la hidroxiapatita mediante mezclas de soluciones acuosas de compuestos que contienen iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} a un pH de 7, seguido de la retención del precipitado en condiciones apropiadas, las fuentes de Ca^{2+} y PO_4^{3-} para la precipitación de la hidroxiapatita. Algunos ejemplos de fuentes de Ca^{2+} (CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$.) y PO_4^{3-} (H_3PO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Na_3PO_4 , y K_3PO_4 .)

2.2.5 Técnicas de caracterización de la hidroxiapatita

Las técnicas de caracterización son una disciplina de la ciencia de los materiales que permite estudiar, clasificar y analizar las propiedades físicas, mecánicas, ópticas, químicas, térmicas y magnéticas de un mineral. En el caso de la hidroxiapatita, es importante su caracterización para que sea usada en diferentes aplicaciones biomédicas. La microscopía electrónica de barrido, espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier y la difracción de rayos X, son técnicas valiosas para su análisis de estructura y composición.

2.2.5.1 Microscopía electrónica de barrido

Éste es un método adaptado al estudio de la morfología de las superficies. A diferencia de un microscopio óptico que utiliza fotones del espectro visible, la imagen de este tipo de microscopio se genera por la interacción de un haz de electrones que barre un área determinada sobre la superficie de la muestra. Mide

la cantidad de electrones secundarios que se generan en la muestra debido al bombardeo del rayo de electrones. Al bombardear la muestra con electrones se genera energía, parte de ésta energía es absorbida por la muestra y genera los electrones secundarios que abandonan la superficie de la muestra y son recolectados por el detector (McClemements, 2014).

Se han realizado estudios de morfología y tamaños de partícula a los polvos de hidroxiapatita, como en el caso de Rangel *et al.* (2007) que trabajo con compositos de poliuretano e hidroxiapatita , Martínez-Valencia *et al.* (2008) estudio hidroxiapatita obtenida por síntesis química, Giraldo-Betancur *et al.* (2013) trabajo con hidroxiapatita extraída de hueso de bovino y con hidroxiapatita comercial; en estos trabajos se realizó una preparación de la muestra, que consiste en fijar la muestra con cinta de grafito y metalizadas con oro, esto se hace con la finalidad de garantizar la conductividad en la muestra. Giraldo-Betancur *et al.* (2013) realizó un estudio en el que diferencia la morfología de 5 polvos de hidroxiapatita comercial y de hidroxiapatita natural (bio-Hap), la cual paso por tres procesos para su obtención (desengrasado, alcalino y calcinación). La muestra calcinada presentó una superficie con poros que correspondían a la eliminación de colágeno. En los casos de Hap-comercial, la morfología de todas las muestras era similar a la muestra calcinada, gracias al estudio de la morfología se concluyó que la metodología propuesta en ese trabajo cumple con las características de las hidroxiapatitas comerciales. Esta técnica de caracterización también es empleada para determinar tamaños de partícula, como es el caso de Rangel *et al.* (2007), que presento diferentes tamaños de partícula debido a las diferentes rutas químicas de obtención; por ejemplo los materiales obtenidos por precipitación con agitación mecánica y precipitación con agitación ultrasónica, en la que se constituyen agregados irregulares de partículas, notándose la diferencia obtenida en los materiales cristalizados hidrotérmicamente y sintetizados por sol-gel.

2.2.5.2 Difracción de rayos X

Los rayos X son una radiación electromagnética de longitud de onda corta producida por el frenado de electrones de elevada energía o por transiciones de electrones que se encuentran en los orbitales internos de los átomos. El intervalo de longitudes de onda de los rayos X comprende desde aproximadamente 10-6 nm hasta 10 nm, sin embargo la espectroscopía de rayos X convencional se limita, en su mayor parte, a la región de aproximadamente 0,01 nm a 2,5 nm (Cullity, 1956).

La técnica consiste en hacer incidir un haz de rayos X sobre el sólido sujeto a estudio. La interacción entre el vector eléctrico de la radiación X y los electrones de la materia que atraviesa dan lugar a una dispersión. Al producirse la dispersión tienen lugar interferencias (tanto constructivas como destructivas) entre los rayos dispersados, ya que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación. El resultado es la difracción, que da lugar a un patrón de intensidades que puede interpretarse según la ubicación de los átomos en el cristal, por medio de la ley de Bragg. La misma postula que cuando un haz de rayos X incide sobre la superficie de un cristal formando un ángulo θ una porción del haz es dispersada por la capa de átomos de la superficie; la porción no dispersada del haz penetra en la segunda capa de átomos donde, nuevamente una fracción es dispersada y así sucesivamente con cada capa hasta la profundidad de aproximadamente 1000 nm, lo que lo hace una técnica másica. El efecto acumulativo de esta dispersión producida por los centros regularmente espaciados del cristal es la difracción del haz (Skoog, 2001).

Esta técnica ha sido empleada para comparar las fases y porcentajes cristalinos de polvos de hidroxiapatita. Paul *et al.*, (2002) usó la técnica de difracción de rayos X para determinar las impurezas de sus polvos de hidroxiapatita obtenidos por precipitación química de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y H_3PO_4 ; Orozco *et al.* (2013) identificó los picos característicos de la estructura cristalina hexagonal compacta correspondiente a la Hap; Giraldo-betancur *et al.* (2013) comparó las fases cristalinas de la hidroxiapatita obtenida de hueso de fémur de bovino y de

hidroxiapatita comercial; Ramirez-Gutierrez *et al.* (2015) identifico las fases cristalinas de tres métodos de obtención de Hap.

2.2.5.3 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

La espectroscopia infrarroja, es el método por el cual se estudia la absorción o emisión de energía radiante originada por la interacción entre la radiación electromagnética en la región del “infrarrojo” que comprende de 200 cm^{-1} , a $20,000\text{ cm}^{-1}$ y el material en estudio. La molécula absorbe la energía de fotones de la radiación infrarroja, el caso en que exista una diferencia en el momento dipolar de la molécula mientras ocurre un movimiento vibracional, rotacional y cuando la frecuencia asociada con la radiación resuena con el movimiento vibracional. Cuando se hace un análisis IR se mide la intensidad del haz antes (I_0) y después (I) de que interaccione con la muestra (Skoog, 2009). El resultado se expresa en función de la frecuencia de la luz incidente

Con la finalidad de comparar los grupos funcionales de hidroxiapatita comercial con respecto a hidroxiapatitas a partir de fuentes biogenicas, Giraldo-Betancur *et al.* (2013) y Orozco *et al.* (2013) usaron hueso de bovino y cerdo respectivamente, con la finalidad de encontrar los grupos funcionales correspondientes a la molécula de hidroxiapatita.

2.2 Extracción por fluidos supercríticos

La tecnología de fluidos supercríticos ha tenido un notable interés industrial en las últimas décadas ya que se ha utilizado como medio de reacción, reemplazando solventes convencionales en la síntesis de algunos compuestos orgánicos. Un fluido supercrítico tiene la propiedad de difundirse a través de los

sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido. Adicionalmente, puede cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas propiedades lo hacen conveniente para ser usado como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción. Un fluido supercrítico puede definirse como una fase densa, cuya presión y temperatura están por encima de su punto crítico (Velasco *et al.* (2007) lo escrito anteriormente se muestra en la figura 2.2.

En el punto crítico existe una sola fase con propiedades comunes a los líquidos a saber, densidad, y otras comunes a los gases, tales como viscosidad, compresibilidad y coeficiente de difusión de masa. Velasquez, (2008) señala que aparecen dos puntos característicos: *el punto triple*, PT, donde coexisten los tres estados, y *el punto crítico*, PC, al final de la curva de vaporización. Se advierte, además, que la línea de vaporización, línea PT – PC, tiene la singularidad de desaparecer en el punto PC, *el punto crítico*, a unos valores termodinámicos de presión y temperatura que se denominan *presión crítica (Pc)* y *temperatura crítica (Tc)*, respectivamente. En la tabla 2.3, se indican las propiedades críticas de algunas sustancias usadas como solventes en estado supercrítico.

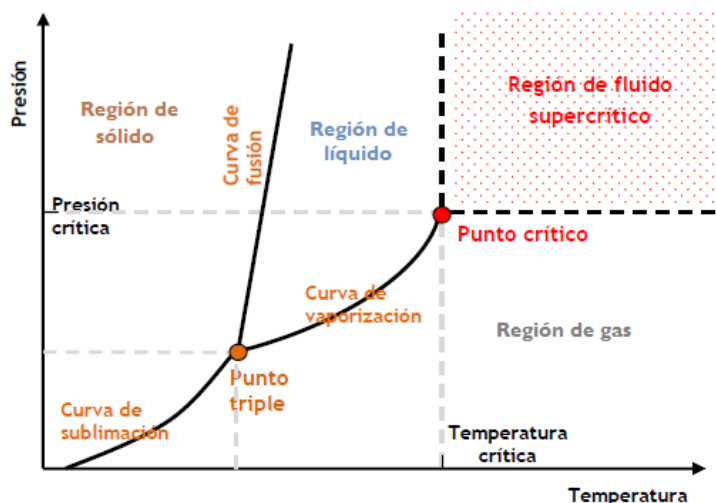


Figura 2.2: Diagramas de fases de un compuesto puro

En el caso especial de fluidos que se encuentran a presión y/o temperatura subcríticas, pero a densidades próximas a la crítica, se hablará de “fluidos cuasi-críticos”, los cuales presentan muchas veces propiedades semejantes a los fluidos supercríticos (Gañaán, 2014).

Dos fluidos en estado supercrítico de interés especial son el CO₂ y el agua. El CO₂ tiene una temperatura crítica de 304.25 K y una presión crítica moderada de 7.3×10^7 Pa: es no inflamable, no tóxico y compatible con el medio ambiente. Se utiliza a menudo para remplazar freones tóxicos y ciertos solventes orgánicos. Además es miscible con una variedad de solventes orgánicos y se recupera rápidamente después de procesar. Es una molécula lineal pequeña que se difunde más rápido para los solventes y líquidos convencionales. También puede utilizarse otros fluidos en estado supercrítico, pero la opción final dependerá de la aplicación específica y los factores adicionales como: seguridad, inflamabilidad, costo del fluido conducta de la fase y solubilidad a las condiciones de operación.

Tabla 2.3: Temperatura crítica (Tc), presión crítica (Pc) y densidad crítica (ρ_c) de algunos fluidos

Compuesto	Tc (K)	Pc (Pa)	ρ_c (kg/m ³)
Metano	190.6	4.60×10^6	162
Etano	305.4	4.88×10^6	203
Etileno	282.4	5.03×10^6	218
Propano	369.8	4.24×10^6	217
Propileno	365.0	4.62×10^6	233
Dióxido de carbono	304.2	7.38×10^6	486

Agua	647.3	2.20×10^7	322
Amoníaco	405.6	1.13×10^7	235
Dietil éter	467.7	3.64×10^6	265
n-Pentano	469.6	3.37×10^6	237
Acetona	508.1	4.70×10^6	278
Metanol	512.6	8.09×10^6	272
Benceno	562.1	4.89×10^6	302
Tolueno	591.7	4.11×10^6	292
Piridina	620.0	5.63×10^6	312
Clorotrifluorometano	302.0	3.92×10^6	579

2.3 Propiedades de los fluidos supercríticos

El uso de los fluidos supercríticos como solventes aprovecha el efecto de su alta densidad (del tipo de líquidos) combinado con su alta difusividad y baja viscosidad (del tipo de gases). Estas propiedades intermedias se ven reflejadas y cada una de ellas puede ser aprovechada en los diferentes procesos de separación. Liadakis, (2003) describe en su libro que el modelado matemático, la simulación y el diseño de un proceso EFS requieren conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos de interés. Se puede obtener una interpretación adicional de los valores de las propiedades fisicoquímicas mediante la comprensión del comportamiento molecular.

La temperatura y la presión crítica, la compresibilidad, la densidad, la capacidad calorífica, la constante dieléctrica, la viscosidad, la difusividad y la conductividad térmica son propiedades importantes, que son necesarias para la caracterización del disolvente y los solutos en un proceso de extracción. Las propiedades de componentes puros, así como las propiedades de la mezcla, se utilizan para describir las características individuales de solutos y disolventes, y cómo el soluto y el disolvente se comportan como componentes de las mezclas.

2.4 Extracción de proteína con H₂O subcrítica

En sus estados más habituales, el agua se presenta en tres formas: sólida (hielo), líquida y gaseosa (vapor de agua). A una presión ambiente de 101kPa (1atm), el agua se encuentra en forma de hielo por debajo de la temperatura de fusión 273.15 K (0°C). Agua sobre calentada; se refiere al agua cuya temperatura está comprendida entre el punto de ebullición (100 °C) y la temperatura crítica (374 °C) y que se mantiene líquida por efecto de la presión. También se le conoce como agua subcrítica.

En el caso de sustancias polares como el agua en condiciones supercríticas, la sustancia es capaz de disolver compuestos orgánicos insolubles en la fase líquida a temperatura ambiente. Este comportamiento permite estudiar procesos que en fase líquida no serían posibles por los límites propios de la solubilidad de la gran mayoría de los compuestos orgánicos de baja polaridad.

El agua en estas condiciones ($T_c=647$ K, $P_c=22,1$ MPa \approx 221 atm), presenta una serie de propiedades como las que se destacan a continuación:

- ✓ Es capaz de disolver especies polares e iónicas como líquido,

✓ Las sustancias no polares se disuelven fácilmente, y esta capacidad se ha empleado para limpieza de suelos, remoción de metales, hidrocarburos aromáticos polinucleares, etc.

✓ La extracción con agua a altas temperaturas seguido de la oxidación en condiciones supercríticas es un procedimiento que aprovecha los cambios de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia, haciendo que esta técnica se aproveche para el tratamiento de residuos sólidos y desechos líquidos.

✓ La constante dieléctrica del agua líquida a temperatura ambiente disminuye hasta presentar valores cercanos a los de líquidos orgánicos, como la acetona.

✓ En esas condiciones, el agua se convierte en un medio más ácido (el valor del pH disminuye de 7 a temperatura ambiente a un valor cercano a 4), lo que permite desarrollar estudios de reacciones catalizadas por ácidos.

✓ La reactividad del agua se incrementa, ya sea en presencia o ausencia de catalizadores (Brunner, 1994).

✓ La viscosidad de esta sustancia se acerca a la esperable para un gas en condiciones normales (1×10^{-5} N.s.m⁻²), y el coeficiente de difusión se incrementa un orden de magnitud, permitiendo que gases como O₂, NH₃, CO₂, N₂, etc. se vuelvan completamente miscibles en condiciones supercríticas.

Varios autores han realizado estudios usando agua en condiciones subcrítica, un ejemplo de ella es la extracción de antioxidantes a partir de plantas de romero Ibañez *et al.* (2003), la extracción de bifenilos policlorados del suelo y sedimentos Yang *et al.* (1995), extracción de hemicelulosas de encino (*Quercus ilex*) Yedro *et al.* (2017), extracción de curcuminoides a partir de cúrcuma Perko *et al.* (2016), y extracción de proteínas y aminoácidos de valor agregado a partir de salvado de arroz Sereewatthanawut *et al.* (2008) y polifenoles a partir de pieles de uva Duba *et al.* (2015).

Barakat *et al.* (2009) Comparo tres procesos de obtención de hidroxiapatita, uno de ellos fue usando agua en condiciones subcríticas para la extracción de colágeno, el otro proceso fue una hidrólisis hidrotérmica alcalina y por último un proceso de calcinación, es importante mencionar que para la extracción de lípidos empleó maceraciones con acetona, de ese trabajo se concluyó que los tres métodos propuestos son viables para la obtención de Hap.

2.5 Extracción de lípidos con fluidos supercríticos

Los procedimientos que usan CO₂ SC han recibido especial interés debido a las ventajas de este solvente, el que además de no ser tóxico, ni inflamable, no deja residuos indeseables en los extractos de interés, esta tecnología se emplea en la industria cosmética, farmacéutica, en la industria alimenticia, en la extracción de materiales vegetales o animales, en la descafeinización de café y en la biomédica. Por mencionar algunos, Jachmanian *et al.* (2006) emplearon CO₂ SC para la extracción de aceite de canola y se analizó la variación de la concentración de tocoferoles a lo largo de la extracción supercrítica, sin embargo no se mencionaron las condiciones de presión y temperatura de la extracción supercrítica. Fages *et al.* (1994) también emplearon CO₂ SC para extraer grasa del hueso de fémur de bovino y posteriormente uso un proceso alcalino para la extracción de la proteína, esto lo realizó para obtener hidroxiapatita y ésta sea empleada en injertos óseos, sin embargo no reportaron las condiciones de presión y temperatura para la extracción de lípidos. También se ha utilizado CO₂ SC y etanol presurizado para extraer compuestos antioxidantes en la piel de mango (*Mangifera indica L.*) (García *et al.*, 2012).

El etanol es otro solvente usado en extracciones de lípidos, ya que es producido por procesos biotecnológicos. Además, está disponible en grandes

cantidades a bajo costo, es menos agresivo para el medio ambiente y es generalmente reconocido como seguro (GRAS). Rodrigues *et al.* (2014) hace mención del etanol en extracciones de lípidos ya que es menos inflamable y menos explosivo, su temperatura crítica es de 243 °C y 6.3×10^7 . Se han propuesto varios tipos de disolventes alcohólicos para la extracción de aceites de matrices sólidas como semilla de girasol (Baudler *et al.*, 2016), frijol de soya (Rodrigues *et al.*, 2011), grano de arroz (Bessa *et al.*, 2017).

2.6 Aplicaciones de los fluidos supercríticos

La tecnología supercrítica nació en Alemania, con la primera aplicación a gran escala en la industria alimenticia para descafeinado de café y té, extracción de resinas de lúpulo, posteriormente en extracción de aromas, colorantes, industria farmacéutica y cosmética (Espinosa, 2001). En la tabla 2.4 se presenta un resumen de algunas de las aplicaciones que utiliza fluidos supercríticos, enumerando los aspectos más destacados y los principales usos industriales.

Tabla 2.4: Algunas aplicaciones de los Fluidos Supercríticos (Espinosa, 2001)

	Procesos	Ventajas
Extracción	Primer uso comercial. Lúpulos y cafeína de café remoción de nicotina de tabaco, desasfaltado de petróleo, extracción de aceites de semillas oleaginosas y extracción de aceites esenciales para saborizantes o perfumes.	Velocidad debida a la alta difusión, reduce el tiempo de preparación de muestras, recuperación de analitos de muestras sólidas y semisólidas, limpia para el medioambiente, no deja residuos, se obtienen extractos de alta pureza y no requiere altas temperaturas.
Fraccionamiento	Productos naturales como aceites esenciales y lípidos.	Única unidad, limpia para el medio ambiente, ausencia

de mezclas líquidas	Para concentrar sustancias antes de cromatografía. Extracción en contracorriente y con reflujo.	de solvente residual en el producto final.
Cromatografía		Mayor eficiencia en la separación, limpia para el medio ambiente, ausencia de solvente residual en el producto final
Reacciones químicas	A escala de laboratorio e industrial. La existencia de una sola fase permite una óptima transferencia de masa y de energía. Variación de parámetros del solvente (por dependencia de P) como la constante dieléctrica afectando la selectividad de las reacciones enzimáticas o catalíticas. Variación del potencial químico de reactivos y catalizadores sin modificar el volumen de reacción debido a la alta compresibilidad.	Aumento de la velocidad de reacción en procesos que ocurren en fase líquida (controlados por la difusión), cambios en la selectividad, control y fácil separación de los productos, menor riesgo en las condiciones de trabajo, limpia para el medio ambiente, reducción en el costo de eliminación del disolvente.
Procesado de metales	Impregnación y teñido de polímeros y fibras sintéticas. Extracción, separación y regeneración de metales empleando agentes completantes	Reducción de la contaminación del agua.
Formación de partículas	Micro partículas por diferentes técnicas de precipitación y cristalización, procesado de materiales y productos farmacéuticos	Obtención de cristales con morfología muy uniforme, alta pureza y libres de residuos de disolvente.
Agua supercrítica	Extracción de plantas para producir sabores, fragancias y productos de alto valor agregado	Menor polución en el trabajo y para el medio ambiente, ausencia de solvente residual en el producto final, reducción en el costo de eliminación del disolvente
	Regeneración de aguas y suelos y otros materiales por extracción y destrucción	

	(oxidación total)	
--	-------------------	--

3 SINTESIS DE ANTECEDENTES

La hidroxiapatita bovina, porcina, y humana es usada en aplicaciones biomédicas ya que presenta una buena compatibilidad, osteointegración y no es tóxico en el huésped; es por ello el interés de obtenerla a partir de bio-residuos (Orozco *et al.*, 2013; Giraldo-Betancur *et al.*, 2013).

El CO₂ SC y etanol han sido empleados para la extracción de lípidos de diferente matrices orgánicas, como son semilla de girasol (Baudler *et al.*, 2016), frijol de soya (Rodrigues *et al.*, 2011), grano de arroz (Bessa *et al.*, 2017). También se ha utilizado CO₂ SC y etanol presurizado para extraer compuestos antioxidantes en la piel de mango (García *et al.*, 2012). Y para aporte de este trabajo se encontró que Fages *et al.* (1994) realizó una extracción de lípidos del hueso de bovino usando CO₂ SC, sin embargo no reporta las condiciones de presión y temperatura. De igual manera solo se presenta un par de artículos de extracción de proteínas usando agua en condiciones subcríticas, pero solo uno de interés para este trabajo. Cabe destacar que Barakat *et al.* (2009) realiza una extracción de colágeno del hueso de bovino con agua en condiciones subcríticas, de la cual no menciona las condiciones de presión y temperatura aplicada a dicha extracción.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Purificar y caracterizar hidroxiapatita de hueso de bovino usando fluidos supercríticos y cosolventes.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar el efecto de la presión y temperatura sobre la extracción de grasa con CO₂ supercrítico y etanol como cosolvente.
- Evaluar el efecto de la presión y temperatura sobre la extracción de proteína con CO₂ supercrítico y agua como cosolvente.
- Caracterizar los polvos de Hap obtenidos por diferentes técnicas como difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido y análisis termogravimétrico.

5 MATERIALES Y METODOS

5.1 Descripción general

Con el propósito de obtener hidroxiapatita purificada a partir de fémur de bovino, se propuso extraer la grasa presente en el hueso usando CO₂ SC y etanol y para extraer las proteínas se usó H₂O en condiciones subcríticas, en la figura 5.1 se muestra la metodología general del proceso de purificación, donde se visualizan los análisis realizados a los polvos de hueso, así como la etapa de extracción, la cual se dividió en dos etapas respectivamente. Se determinó el contenido de grasa de los refinados de la extracción supercrítica con CO₂ y Etanol por medio del método Soxhlet y se realizaron análisis térmicos a los polvos obtenidos después de la extracción con agua subcrítica para conocer el porcentaje de mineral. Es importante mencionar que una vez obtenida las condiciones de presión, tiempo y temperatura de cada una de las extracciones, se realizó una operación simultánea de la extracción de lípidos y proteínas. A los polvos con mejores porcentajes de purificación se les realizó Difracción de Rayos X (XRD), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).

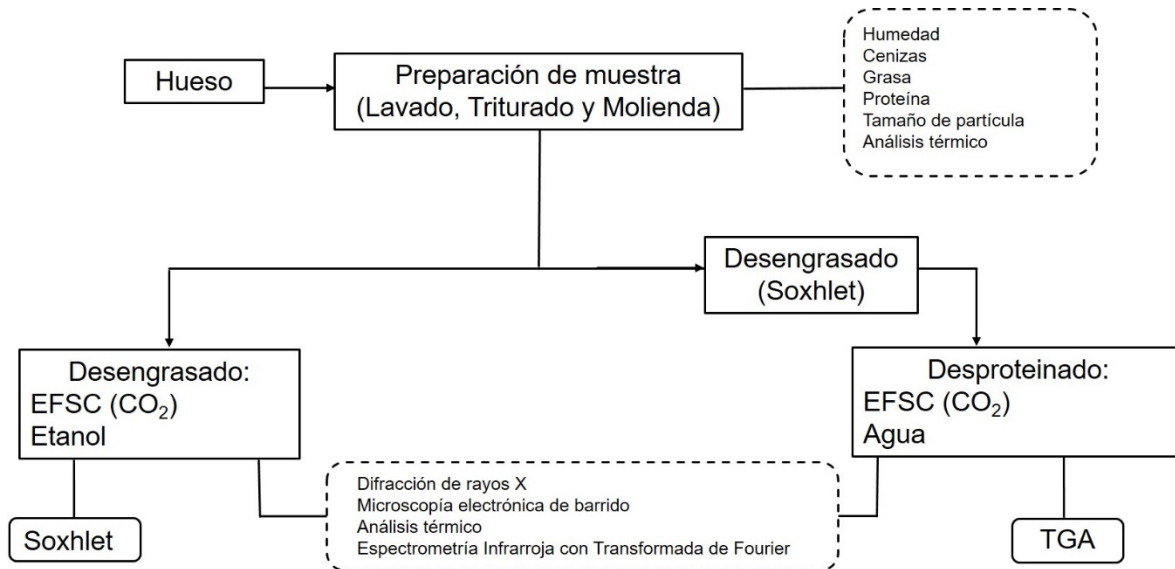


Figura 5.1: Metodología general de la purificación de hidroxiapatita a partir de hueso de bovino

5.2 Preparación de la muestra

La limpieza del hueso consistió en remover musculo, cartílago, medula ósea amarilla y hueso blando del fémur de bovino, posteriormente se removió la epífisis proximal (extremos del hueso), dejando la parte central del fémur (hueso cortical), ésta fue cortada en rodajas de 1 cm empleando una cortadora de hueso y carne de acero inoxidable con una potencia de $\frac{3}{4}$ HP (la cual se encuentra en la distribuidora de dicha materia prima). Las rodajas de hueso se redujeron a un tamaño de 0.5 a 1 cm usando una sierra caladora BT-JS 400 E. Por último el hueso se pulverizó usando un molino Pulvex 200 con una potencia de 5 HP y 3475 RPM, el cual se encuentra en la UNIDA. Las figuras 5.2 a la 5.5 ilustran la preparación de la muestra.



Figura 5.2: Fémur de bovino limpio



Figura 5.3: Rodajas del hueso cortical



Figura 5.4: Trozos de hueso de fémur de bovino



Figura 5.5: Polvos de hueso

5.3 Caracterización de los polvos de hueso

5.3.1 Determinación de humedad

El contenido de humedad de los polvos de hueso de bovino se determinó por pérdida de peso en una estufa a vacío marca LAB LINE VACUUM OVER a una temperatura de 60 °C y 600 mbar, hasta llegar a peso constante. El análisis se realizó por triplicado y se determinó la humedad por diferencia de peso.

5.3.2 Determinación de humedad y cenizas por medio de análisis térmico.

Este análisis se realizó en un TGA Q500 con la finalidad de determinar la composición de la muestra midiendo el peso de cada componente a medida que se volatiliza o descompone bajo condiciones controladas de temperatura, tiempo y atmosfera. El equipo se encuentra en el anexo del laboratorio de ingeniería de alimentos de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos UNIDA

Para determinar el contenido de humedad en los polvos de hueso, se estableció una rampa de 10°C/min a 105°C, y para el contenido de cenizas presentes en la muestra se estableció una rampa de 10°C/min hasta 950 °C.

5.3.3 Determinación de proteínas

El método se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio, libera amoníaco. Los polvos de hueso de bovino se analizaron por duplicado en el laboratorio GAQSA en la ciudad de Querétaro.

5.3.4 Determinación de grasas por método de Soxhlet.

Es una extracción semi-continua con un disolvente que se calienta hasta ebullición, este se evapora y condensa en la trampa Soxhlet llegando siempre de manera pura al cartucho con la muestra con la finalidad de extraer los lípidos embebidos en la muestra.

En este trabajo se determinó el contenido de grasa presente en la muestra de hueso usando éter de petróleo como solvente a una temperatura de ebullición de 50°C, una vez finalizada la extracción, se dejó enfriar el matraz y se procedió a separar los lípidos extraídos y el solvente en un rota evaporador BÜCHI SWITZERLAND, usando una temperatura de 40°C y una presión de 380 mbar. El porcentaje de grasa se calculó por diferencia de peso.

5.3.5 Análisis por cromatografía de gases.

La cuantificación de los ácidos grasos presentes en la matriz orgánica de hueso de bovino se determinó mediante una metilación ácida usando 18 mg de

muestra y se mezcló con 1.5 mL de H_2SO_4 1M en metanol, la cual se calentó por 30 min a 60°C y se enfrió en un baño de hielo por un minuto. Posteriormente se le agregaron 2 mL de hexano con el estándar y 2 mL de NaCO_3 y se centrifugó a 3500 rpm por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se reservó en un vial a temperaturas de congelación. La cuantificación se realizó en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 6890 equipado con un detector de ionización de flama y se utilizó una columna capilar HP-INNOWAX de Polietilenglicol (60 mm X 0.25 mm X 0.25 mm). El método consistió en una temperatura inicial de 190°C por 1 minuto seguido de una rampa de 4°C por minuto hasta una temperatura final de 210°C . El tiempo total del análisis fue de 30 minutos. El puerto de inyección se mantuvo a una temperatura de 200°C y el detector a 230°C . Se utilizó nitrógeno de alta pureza como gas acarreador a un flujo constante de 1 mL/min.

5.3.6 Distribución de tamaño de partícula.

El análisis de distribución y tamaño de partícula se realizó en un MASTERSIZER 3000; utiliza la técnica de difracción láser para medir las distribuciones de tamaño de partícula de 10 nm hasta 3.5 mm, usando un dispersor de polvos secos (AERO S), que mide un intervalo de tamaños de 0.1 – 3500 μm , rango de presión del dispersión 0 – 4×10^7 Pa, presión de ajuste de precisión $\pm 0,1$ bar, precisión de la presión $\pm 3 \times 10^5$ Pa, rango de alimentación 0 – 58 m s y una velocidad de avance $\pm 2\%$ FS. Se colocaron de 1 a 5 g de los polvos de hueso de bovino en la porta muestras y se hizo pasar de forma gradual y continua a la celda de medición del equipo, se realizaron 3 medidas de la muestra.

5.4 Extracción con fluidos supercríticos

Para la extracción de los compuestos orgánicos presentes en el hueso de bovino, se usó un equipo de extracción supercrítica Helix (Applied Separations) utilizando CO_2 como solvente en condiciones supercríticas y etanol absoluto y H_2O

como co-solventes, con el objetivo de aumentar la solubilidad de los compuestos orgánicos embebidos en la matriz ósea; para dosificar estos solventes se usó una bomba tipo HPLC con tasas de flujo de 0.01 mL/min a 12 mL/min, con una presión máxima de 6.80×10^7 Pa. La bomba incluye una válvula de retención de alta presión para prevenir el flujo de CO₂.

5.4.1 Extracción con CO₂ SC y etanol

Los ensayos realizados en la extracción de lípidos se llevaron a cabo usando CO₂ SC y etanol, se usó un diseño experimental 3², teniendo como variables la temperatura (80, 100, 120 °C) y la presión (1.5×10^7 , 2×10^7 y 2.5×10^7 Pa); se estableció un tiempo de 60 min, un flujo de 0.4 mL/min de etanol en cada uno de los ensayo y un flujo de 8 L/min en la salida de CO₂. Al finalizar cada ensayo se hizo extracción Soxhlet a los refinados con la finalidad de conocer el porcentaje de grasa extraída a los polvos de hueso.

Se seleccionaron las mejores condiciones de temperatura y presión y se realizó una cinética de extracción usando los flujos de 0.4 y 8 mL/min de etanol, esto se realizó para conocer el tiempo (min) en el que se extraía la grasa presente en los huesos de bovino.

5.4.2 Extracción con CO₂ SC y H₂O subcritica

Para extraer la proteína de los polvos de hueso de bovino, se realizó un diseño experimental 3², teniendo como variables la temperatura (100, 125 y 150 °C) y la presión (2×10^7 , 3×10^7 y 4×10^7 Pa), por un tiempo establecido de 60 min, usando un flujo de 0.4 mL/min de agua y un flujo de 8 L/min en la salida de CO₂.

Una vez finalizada la extracción se realizaban análisis térmicogravimétrico a los refinados de la extracción; este análisis se hizo con la finalidad de determinar el porcentaje de mineral presente en los polvos de bovino de cada uno de los tratamientos. Se seleccionaron las condiciones de presión y temperatura para la extracción de la proteína y se modificó el flujo de agua a 2 mL/min. También se modificó el tiempo a 120 y 300 min.

5.5 Caracterización de los polvos obtenidos

Se seleccionaron 4 muestras de los tratamientos con CO₂ SC, etanol y H₂O subcrítica y una muestra de hueso de bovino en polvo, con la finalidad de caracterizar e identificar el mineral purificado, mediante distintos estudios de sus propiedades físicas, químicas y estructurales. En la tabla 5.1 se indica la nomenclatura asignada a las muestras seleccionadas.

Tabla 5.1: Nombre de las muestras seleccionadas de los mejores tratamientos de la extracción supercrítica y subcrítica.

MUESTRA	DESCRIPCIÓN
H1	Muestra de hueso de bovino
RHS	Muestra de hueso sin grasa por el método Soxhlet
RHG	Muestra de hueso sin grasa por EFSC y cosolvente
RHP	Polvos de hidroxipartita
RHI	Polvos de hidroxipartita (Extracción simultánea)

5.5.1 Análisis térmico:

Se realizó una cinética de pérdida de peso en el TGA Q500, usando una charola de platino en la que se colocaron 10 mg de muestra y se programó una rampa de calentamiento de 10 °C /min hasta 105 °C con una isoterma por 3 min. Esto se realizó con el fin de eliminar todo el agua libre presente en los polvos, posteriormente se programó otra rampa de calentamiento de 10 °C/ min hasta 950 °C para observar el comportamiento de la pérdida en peso de la materia orgánica presente en los polvos de hueso de bovino, además de conocer el porcentaje total del mineral presente en los polvos de hueso y en los polvos tratados con la extracción supercrítica.

5.5.2 Difracción de rayos X:

Esta técnica se realizó en el laboratorio de Ingeniería Química de la Universidad del Papaloapan (UNPA), usando un Difractómetro de Rayos-X Bruker D8 Advance con un generador de radiación de Cu- Cu-K α con filtro de Ni y rejilla de 2 mm y EVA Software. Se ensayaron las muestras en un ángulo 2 θ de 10 a 55° con una corriente de 30 mA y un voltaje de 40 KV.

5.5.3 Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Este análisis se realizó en el laboratorio de Ingeniería Química de la Universidad del Papaloapan (UNPA), usando un espectrómetro Perkin-Elmer de espectro 100FT-IR (ATR) con una resolución de 4 cm⁻¹ y un promedio de 16 exploraciones en el rango 4000-650 cm⁻¹ a temperatura ambiente.

5.5.4 Microscopio electrónico de barrido

Se realizó en un Microscopio Electrónico de Barrido (FE-SEM) Modelo MIRA3, marca TESCAN, ubicado en el anexo del laboratorio de Nanotecnología de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos UNIDA, usando un voltaje de aceleración de electrones de 20 KV. Las muestras se fijaron en un porta muestra con cinta de carbono y se observaron a diferentes aumentos.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización de los polvos de hueso de bovino

6.1.1 Determinación de humedad

El contenido de agua de los polvos de hueso de bovino se evaluó por dos métodos, gravimetría y TGA; obteniendo $5.32 \% \pm 0.9$ y $6.93 \pm 0.54 \%$ (figura 6.1) respectivamente. Estos resultados concuerdan con los datos reportados por (Giraldo-Betancur *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 1999), quienes mencionan que se tiene un 30 % de compuestos orgánicos en el hueso de bovino, Se tiene $29.98 \% \pm 0.04$ de materia orgánica y $64.73 \% \pm 0.39$ de mineral (Hidroxiapatita).

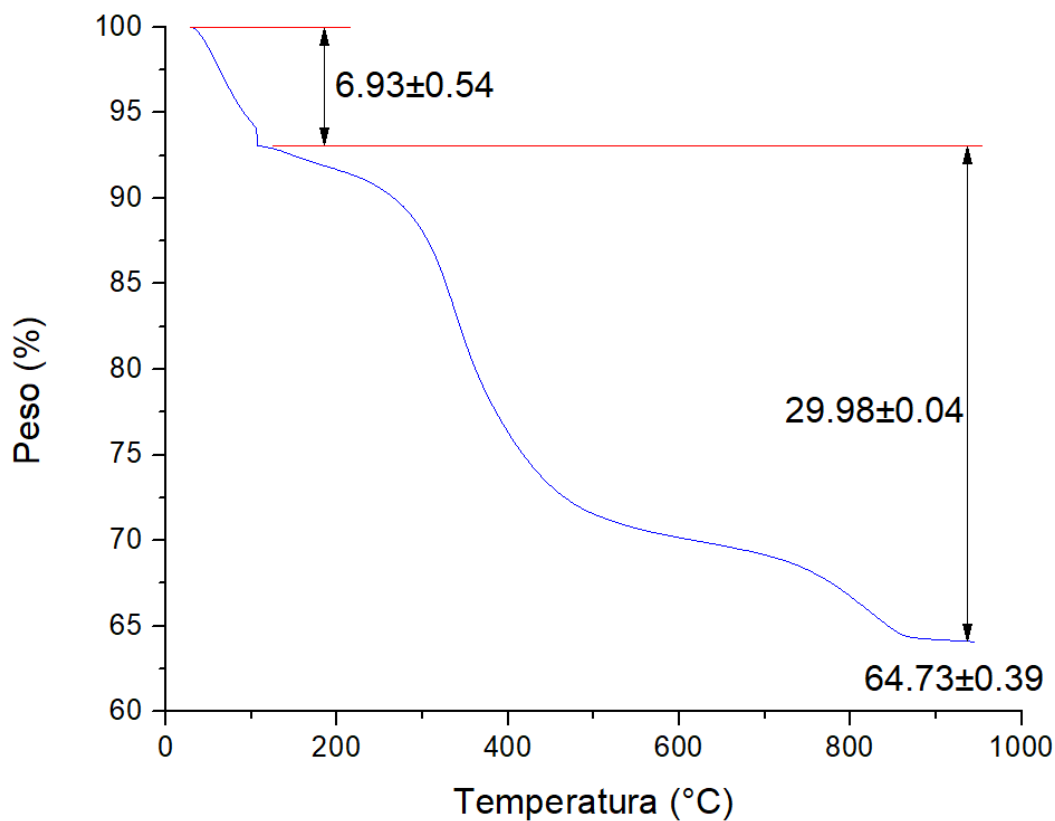


Figura 6.1: Termograma de hueso de bovino

De acuerdo a Sequeda *et al.* (2012), los cambios de pérdida de peso entre 220 y 570 °C corresponde a la degradación y combustión del colágeno; Garcia *et al.* (2006) describen la presencia de otros compuestos como fósforo, magnesio, los cuales posiblemente son degradados entre 600 y 820 °C.

6.1.2 Determinación de la materia orgánica

A. Grasa

Hernández *et al.* (1999) reportó que el hueso de bovino presenta un 4 % de lípidos, sin embargo en este trabajo se presenta un porcentaje de lípidos del 2.46 % \pm 0.35. La tabla 6.1 se presenta la composición de ácidos grasos presentes en el hueso de bovino, los ácidos grasos se identificaron por cromatografía de gases, en la que por medio de un cromatograma en el que se aprecia la aparición de picos con respecto al tiempo de los ácidos grasos, para identificar estos picos, se buscó en la biblioteca del cromatógrafo; en el cromatograma se identificaron la presencia de ácidos grasos saturados como son ác. Mirístico, Palmitoleico y esteárico y también se encuentra ácidos grasos insaturados como son ác. Palmitoleico, Oleico y Linoleico.

Tabla 6.1: Perfil de ácido grasos

DENOMINACIÓN ABREVIADA	ÁCIDO GRASO	% A.G
C:14	Mirístico	1.84
C:16	Palmítico	12.72
C:16:1	Palmitoleico	1.98
C:18	Esteárico	8.78
C:18:1	Oleico	71.08
C:18:2	Linoleico	3.6

B. Proteína

Giraldo-Betancur *et al.* (2013) y Hernández *et al.* (1999) reportan que la materia orgánica presente en el hueso de bovino es de un 30 %, sin embargo no reportan el porcentaje de proteína. En este trabajo de investigación se determinó un $27.5 \% \pm 0.4$ de proteína. Por lo que es importante mencionar que la suma de la grasa determinada por Soxhlet y la proteína es el 29.96 % de materia orgánica presente en el hueso de bovino.

6.1.3 Distribución de tamaño de partícula

Se determinó tamaño de partícula a la muestra molida de hueso de bovino; el análisis se realizó por triplicado, dando una dispersión monodal (figura 6.1) en las tres replicas y presenta un tamaño promedio de partícula de $136 \mu\text{m}$ (tabla 6.2) con un índice de refracción de partícula de 1.620 y un índice de absorción de partícula de 0.1.

Tabla 6.2: Resultados del análisis de la distribución de partícula de los polvos de hueso de bovino

Muestra	Dx (10) μm	Dx (50) μm	Dx (90) μm
R1	33	143	265
R2	31.8	134	244
R3	28.7	126	222
Medias	31.2	134	243
Desviación	2.22	8.08	21.6

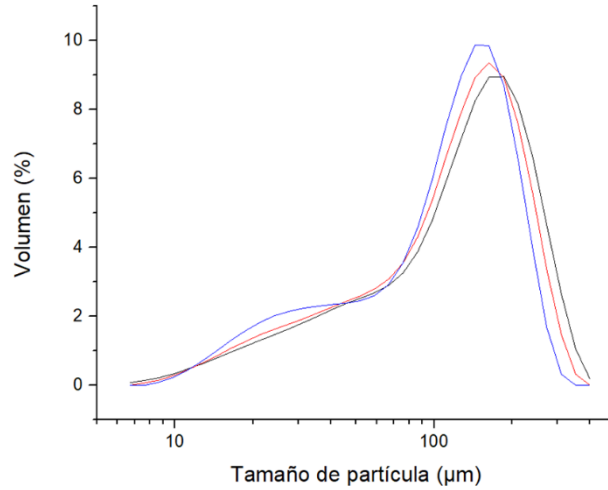


Figura 6.2: Distribución de tamaño de partícula de los polvos de hueso de bovino

6.2 Extracción de lípidos con CO₂-sc y Etanol

Para estos ensayos se usó CO₂-sc y etanol con la finalidad de aumentar la solubilidad del soluto en la fase supercrítica (Espinosa, 2001).

Tabla 6.3: Porcentaje de lípidos extraídos a diferentes condiciones de presión y temperatura

Temperatura (°C)	Presión (Pa,10 ⁻⁷)	% de grasa extraído de la muestra
80	1.5	1.17 ± 0.09
	2	1.34 ± 0.02
	2.5	1.42 ± 0.05
100	1.5	1.51 ± 0.01
	2	1.54 ± 0.05
	2.5	1.65 ± 0.02
120	1.5	1.93 ± 0.03
	2	2.01 ± 0.04
	2.5	2.08 ± 0.02

En la tabla 6.3 se aprecian los diferentes porcentajes de extracción de lípidos del refinado de las extracciones supercríticas, recordando que se tiene un

2.46% \pm 0.35 de grasa en la muestra, es por ello que se tomaron las condiciones de 120 °C y 2.5×10^7 Pa en las que se remueve casi en su totalidad la grasa presente en la muestra.

La figura 6.3 se muestra el efecto de la temperatura y presión sobre la extracción de grasa en los ensayos de CO₂-SC y etanol. El análisis de ANOVA con prueba de Tuckey mostró que hay diferencias significativas para tres temperaturas. La presión de 2×10^7 Pa no es significativamente diferente con las presiones de 1.5×10^7 y 2.5×10^7 Pa, pero si entre Para posteriores experimentos se decidió usar la temperatura de 120 °C y la presión de 2.5×10^7 Pa.

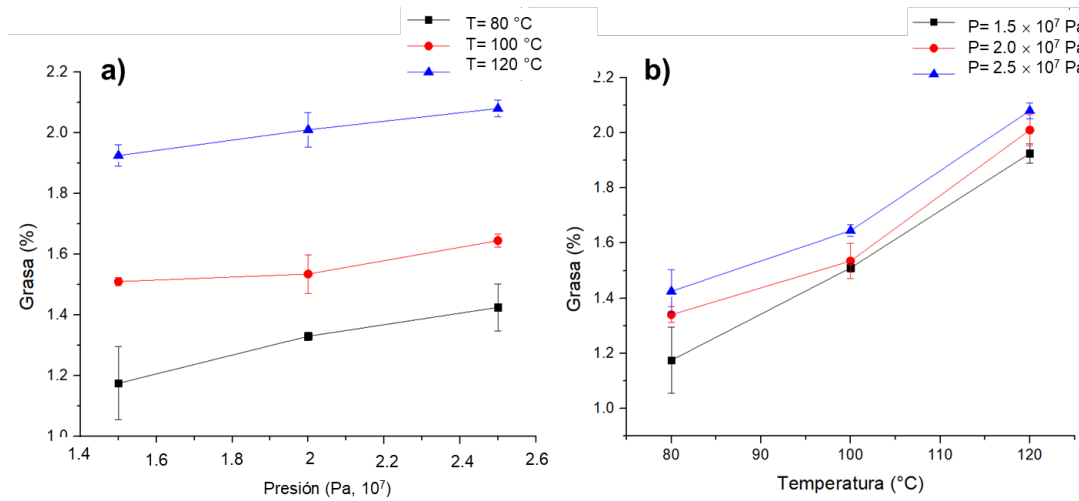


Figura 6.3: Efecto de la presión y temperatura sobre la extracción de grasa en el hueso después de tratamiento con CO₂ y Etanol en condiciones supercríticas

En trabajos relacionados emplean etanol como solvente usando tiempos de residencias de 100 min , por ejemplo: en aceite de oliva (Meiziane y Kadi, 2008), soja (Toda *et al.*, 2016) y en salvado de trigo (Bessa *et al.* 2017); éstos autores coinciden que se requiere de un mayor tiempo de contacto entre el solvente y la matriz para tener altos rendimientos; sin embargo en este trabajo se han obtenidos resultados favorables en tiempos muy cortos de residencia, usando condiciones

de presión supercríticas del etanol y condiciones supercríticas de presión y temperatura del CO₂.

En la figura 6.4 (a) se observa una cinética de extracción demuestra que a 60 min de extracción, el refinado aún se sigue perdiendo grasa; sin embargo en la figura 6.4 (b) se pierde completamente la grasa a los 20 min de extracción supercrítica.

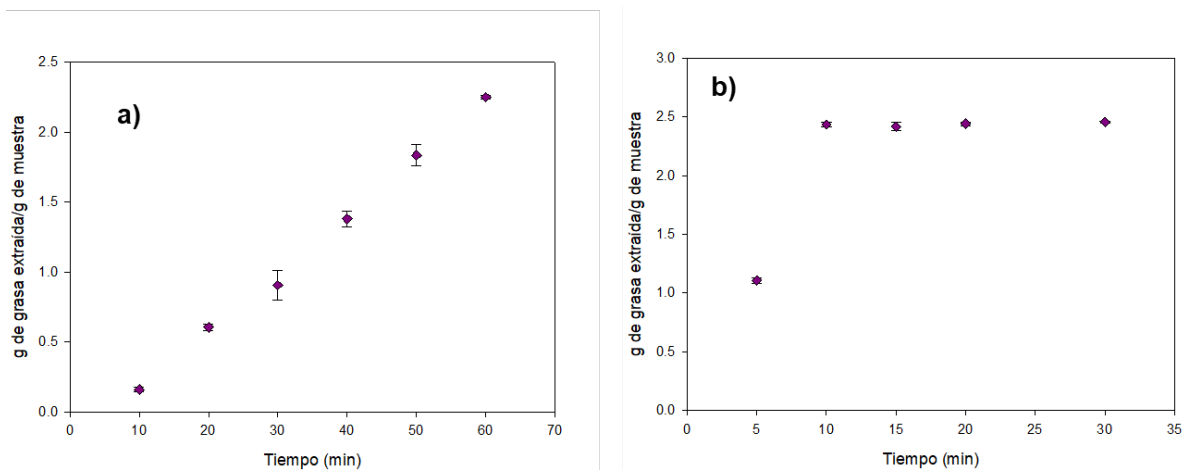


Figura 6.4: Cinética de extracción a) Tratamiento a 0.4 mL/min, b) Tratamiento 8 mL/min.

6.3 Extracción de proteína con CO₂-sc y H₂O-subcrítica

En estos ensayos se usó CO₂-sc y H₂O-subcrítica, en la tabla 6.4 se presentan las condiciones de presión y temperatura empleados en la extracción de las proteínas, en esta tabla se observan los porcentajes del mineral presente en los polvos previamente tratados, este resultado se obtuvo de los análisis termogravimétricos que se le realizaron a los refinados de cada uno de los tratamientos.

Tabla 6.4: Porcentaje de mineral presente en los polvos obtenidos después de la extracción con CO₂ y agua a diferentes concentraciones de presión y temperatura

Temperatura (°C)	Presión (Pa, 10 ⁻⁷)	% del mineral
100	2	70.94 ± 0.25
	3	71.03 ± 0.01
	4	71.79 ± 0.15
125	2	73.86 ± 0.29
	3	73.72 ± 0.35
	4	72.68 ± 0.24
150	2	73.49 ± 0.23
	3	74.33 ± 0.30
	4	75.21 ± 0.15

En este trabajo se determinó que el hueso de bovino tiene un 64.73 % ± 0.39 de mineral, sin embargo al tratar los polvos de hueso con CO₂-sc y H₂O-subcrítica con las condiciones ya mencionadas, se observa que se extrae de un 5 a un 7 % de proteína, por tal razón se decidió aumentar el flujo a 2 mL/ min y usar un tiempo de la extracción de 120 y 300 min, con la finalidad de extraer más proteína.

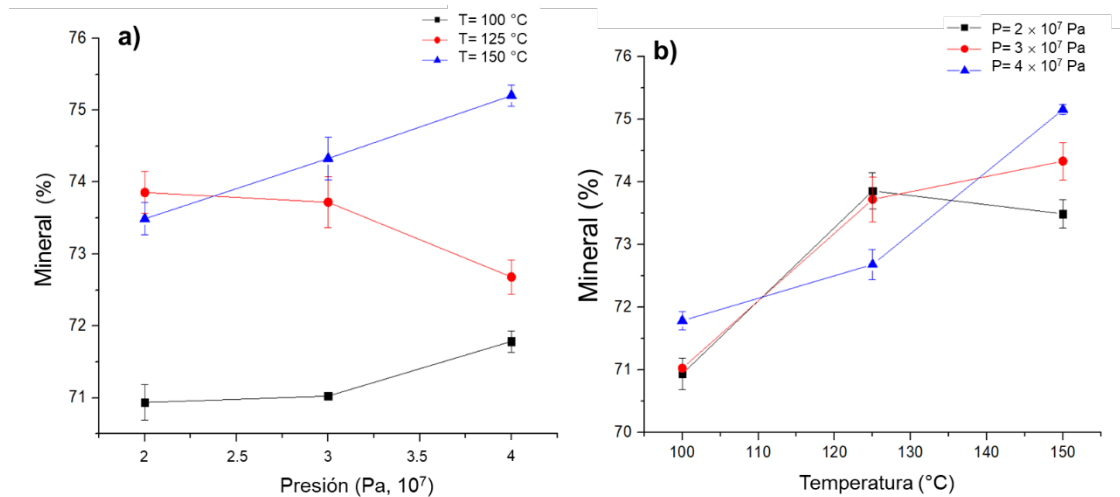


Figura 4.5: Efecto de la presión y temperatura respecto mineral presente en los polvos de hueso tratados con CO₂- SC y H₂O-sub

En la figura 6.5 se presenta el efecto de la presión y temperatura sobre la extracción con CO₂-sc y H₂O-sub en las que se muestra que no hay una diferencia significativa en un rango de 2×10^7 Pa y 3×10^7 Pa entre los grupos de respuesta a 125 y 150°C, pero a 4×10^7 Pa, se observa que hay un incremento en el porcentaje del mineral; es decir la temperatura es una variable que mejora la eficiencia de la extracción de proteína.

6.4 Caracterización de los polvos obtenidos

Se eligieron 5 polvos para la caracterización:

- Hueso de fémur de bovino.
- Polvos de hueso de bovino libres de grasa, (uno desengrasado por el método Soxhlet y otro desengrasado usando CO₂ y Etanol en condiciones supercríticas).
- Polvos de hidroxiapatita purificada usando CO₂-sc y H₂O-sub, en forma discontinua.
- Polvos de hidroxiapatita purificada usando CO₂-sc y H₂O-sub en forma simultánea.

6.4.1 Determinación del contenido de mineral por análisis térmico

Se realizó un análisis termogravimétrico a los polvos seleccionados, ya que es una herramienta que determina los cambios asociados con la degradación de las diferentes fases (lípidos y proteína). En la figura 6.6 se presenta el termograma de los polvos seleccionados. Se presenta el TGA del hueso de bovino (H1) en

polvo sin eliminar la grasa y la proteína, como un control para comparar los polvos desengrasados y de Hap. En los tratamientos de extracción de lípidos, los polvos denominados RHS y RHG muestran un comportamiento similar en la pérdida de peso en función de la temperatura, por lo que el porcentaje del mineral aumenta a un 70%; sin embargo en los polvos denominados RHP y RHI se observa un alto incremento de la pureza del mineral, ya que en el los polvos RHP se observa una pérdida de peso del 25%, logrando tener un 95 % de hidroxiapatita. La muestra que se realizó de forma continua en el reactor de extracciones supercríticas (RHI), se observa una pérdida de peso del 27 % y aumenta a un 97.5 % de hidroxiapatita purificada. Según la literatura encontrada es bien sabido que el grado de seguridad de la hidroxiapatita utilizada en aplicaciones biomédicas o dentales se debe a la ausencia o inocuidad de la materia orgánica.

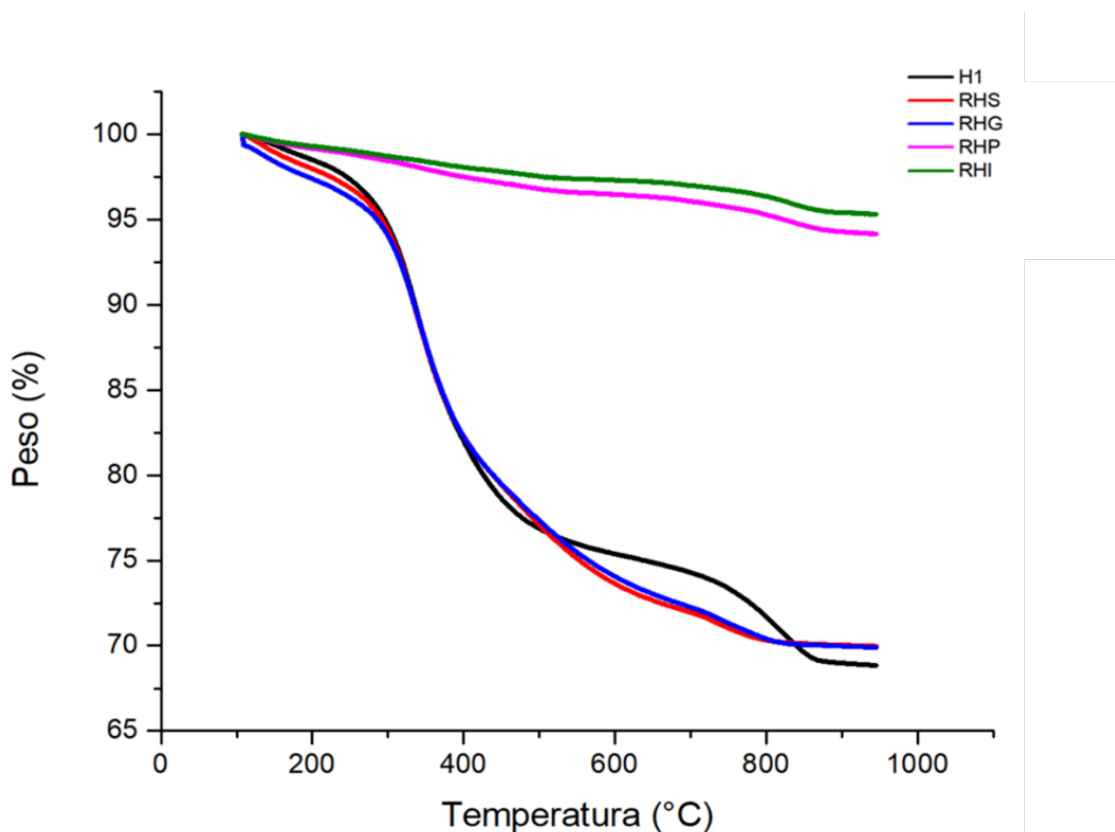


Figura 6.6: Termograma de los polvos de hueso de bovino y los polvos obtenidos de los tratamiento con CO₂-SC, Etanol y H₂O-sub a 150°C y 4×10^7 Pa.

6.4.2 Fases cristalinas

La figura 6.7 muestra los difractogramas de los polvos seleccionados para la caracterización, al igual que en el análisis térmico se presenta el hueso de bovino H1 para estudiar los cambios en los patrones de difracción de rayos X de cada uno de los polvos sin grasa y los polvos de hidroxiapatita purificada usando $\text{CO}_2\text{-SC}$ y $\text{H}_2\text{O-sub}$.

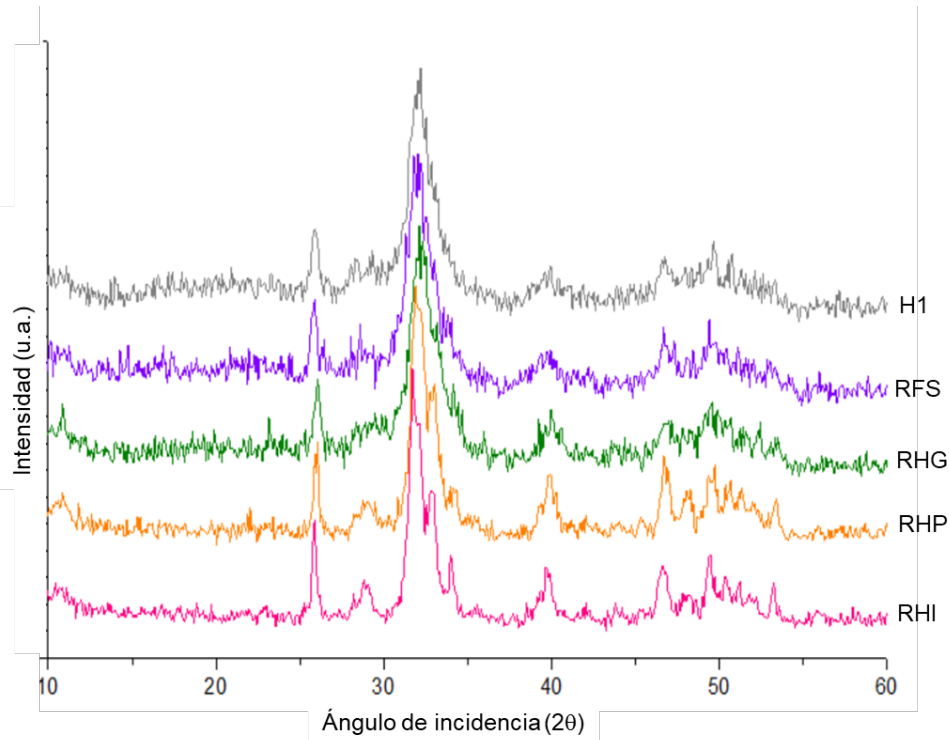


Figura 6.7: Difractogramas del hueso de bovino y de los polvos obtenidos de la extracción sub y supercrítica

Como se observa en los patrones de difracción de los polvos de hueso de bovino sin grasa RFS y RHG, no hay mucha diferencia con el patrón de difracción de H1; sin embargo los picos de los polvos RHG son más definidos que en los polvos RFS, posiblemente esto se deba a las condiciones supercríticas usadas es

posible se elimine algo de proteína y eso haga los picos más definidos en esta extracción, a diferencia de la otra muestra que fue desengrasada por otro método.

Los patrones de difracción de los polvos RHP y RHI muestran una mayor cristalinidad de las muestras, ya que se muestra una mejor definición en los picos, resultado que era de esperarse por lo visto en el TGA. Por ejemplo los polvos RHI muestran una mejor definición en los picos, posiblemente esto se deba a que la muestra se sometió de manera continua en la extracción de lípidos y proteína aumenta la extracción de esta y haciendo que se observe más definidos los picos de difractograma.

6.4.3 Morfología de los polvos de hueso de bovino y los polvos de hidroxiapatita.

En la figura 6.8 se observa la morfología de los polvos observados a una distancia de 200 μm en el microscopio electrónico de barrido (FE-SEM) Modelo MIRA3 marca TESCAN. En las micrografías de los polvos de hueso de bovino (H1) y la muestra desengrasada (RHS), las partículas se ven oscuras debido a que la muestra se encuentra cargada por el haz de electrones por el alto contenido de materia orgánica presente en ella, lo contrario sucede con los polvos de Hidroxiapatita purificados de forma continua con fluidos súper y subcríticos (RHI) se observa claramente que se encuentra libre de materia orgánica.

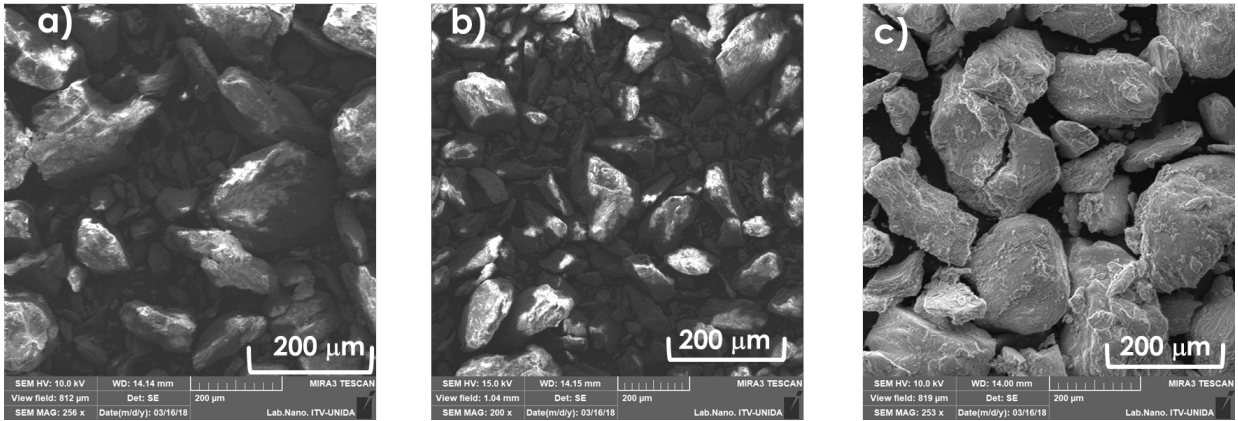


Figura 6.8: Micrografías de polvos: a) Hueso de bovino, b) Hueso de bovino sin grasa, c) Hidroxipatita

Las muestras también fueron observadas a una escala de 2 μm ; la figura 6.9 (a) se observa muy oscura debido a la presencia de materia orgánica ya que se trata de la muestra de hueso de bovino previo a los tratamientos a los que fue sometida. En las figuras 7-10 (b y c) se presentan los polvos de hueso de bovino desengrasados, con la diferencia de que una fue desengrasada por el método Soxhlet y la otra fue desengrasada con CO_2 / Etanol, en la figura 7-10 (c) se observan poros en la partícula, (Levit y Tepper, 2004) describen al dióxido de carbono supercrítico o casi crítico como un agente de expansión en polímeros.

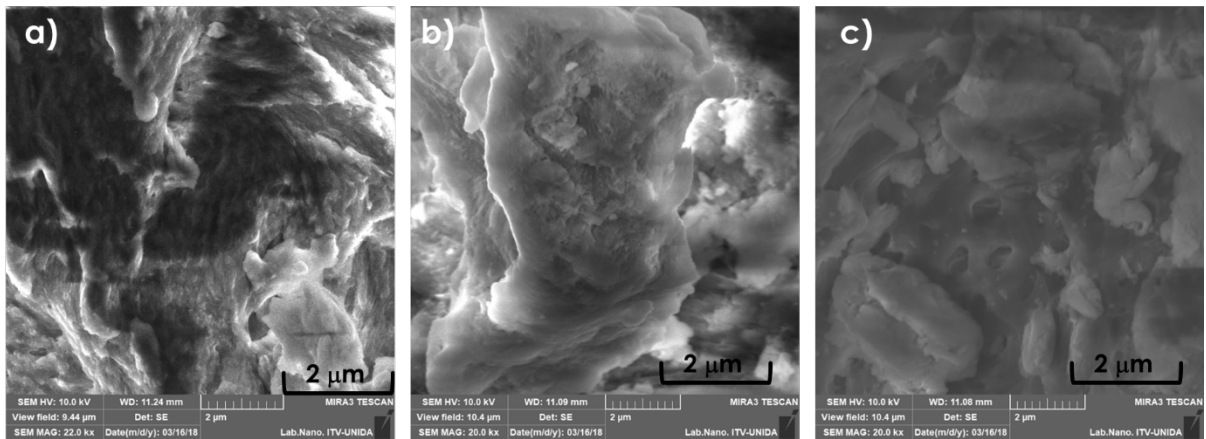


Figura 6.9: Micrografías de: a) Hueso de bovino, b) Hueso desengrasado (Soxhlet), c) Hueso desengrasado (FSC)

En la figura 6.10 ya no se observa presencia de materia orgánica ya que a estas muestras se extrajo la proteína usando $\text{CO}_2\text{-sc}$ y $\text{H}_2\text{O-sub}$, sin embargo en estas muestras no se observa la presencia de poros. Es importante mencionar que para poder discutir resultados de porosidad no solo basta con un método óptico, si no que se pueden realizar otros métodos como son: directos, de imbibición, inyección de mercurio, expansión de un gas y de densidad.

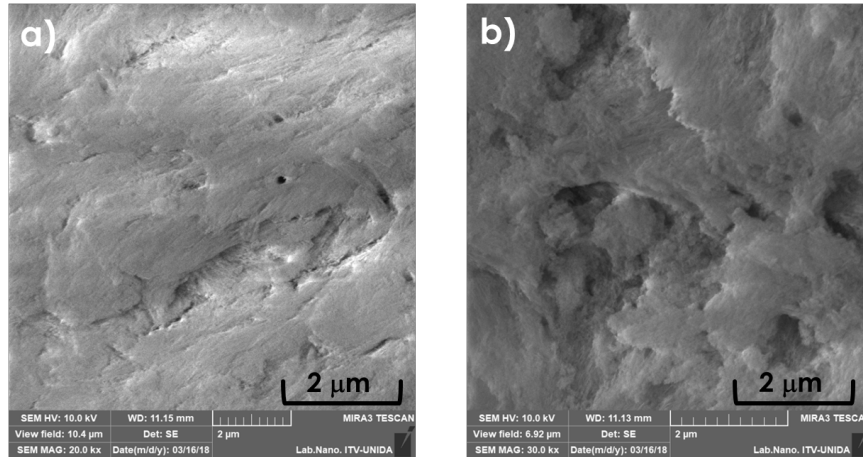


Figura 6.10: Micrografías de polvos de Hap.: a) Extracción discontinúa, b) Extracción continúa

6.4.4 Identificación de los grupos funcionales

En las figuras 6.11 a la 6.15 se muestra el espectro IR de cada una de las bandas características de la estructura de hidroxiapatita. Los picos de absorción de la figura 6.11 ubicados de 500 a 600 muestran la presencia de otros grupos funcionales presentes en la muestra, ya que el huso de bovino además de contener hidroxiapatita contiene lípidos y proteínas.

Giraldo-Betancur *et al.* (2013) describe que los picos de absorción ubicados entre 900 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} muestran la presencia de (CO_3^{2-}) , por lo que en espectros IR de los polvos analizados, muestran la presencia de este grupo, sin embargo después de que las muestras fueron purificadas con $\text{CO}_2\text{-SC}$ y $\text{H}_2\text{O-sub}$

(figura 5-11 y 5-15) se observa una mayor inflexión. Los picos de absorción localizados en 3571 cm^{-1} y 632 cm^{-1} son atribuidos al grupo hidroxilo (OH^-) de la hidroxiapatita, y los picos localizados 1103 y 1040 cm^{-1} , 960 cm^{-1} , 602 y 564 cm^{-1} y 474 cm^{-1} corresponden al grupo (PO_4^{3-}).

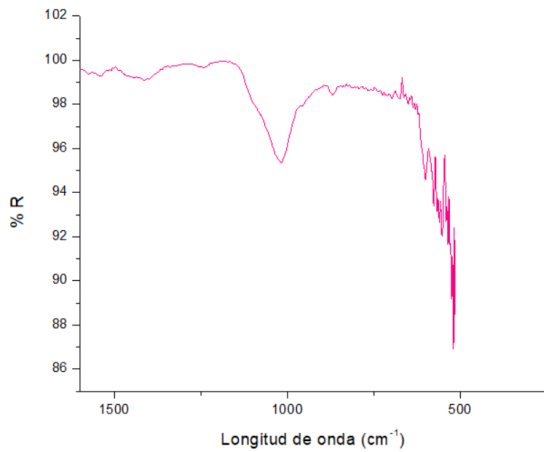


Figura 6.11: Espectro IR de hueso de bovino

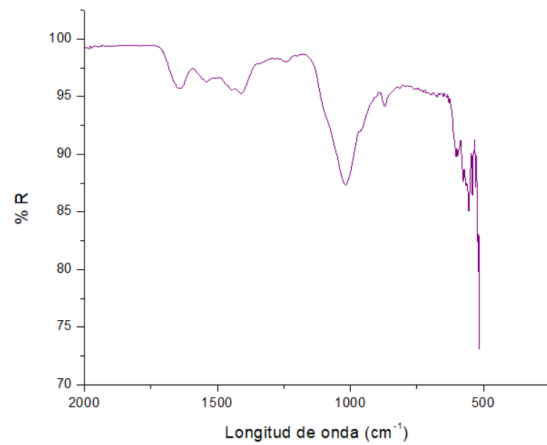


Figura 6.12: Espectro IR de muestra desengrasada por método Soxhlet

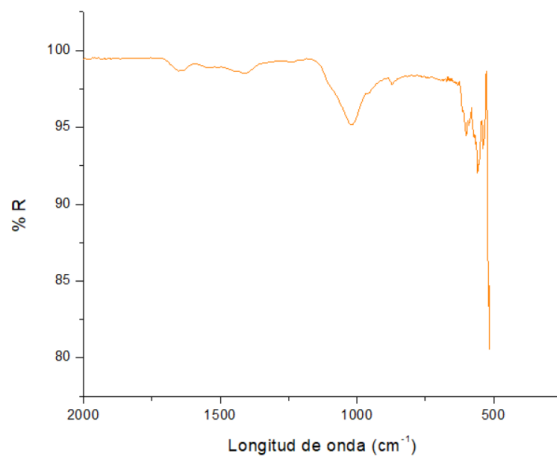


Figura 6.13: Espectro IR de muestra desengrasada por Extrcción supercrítica

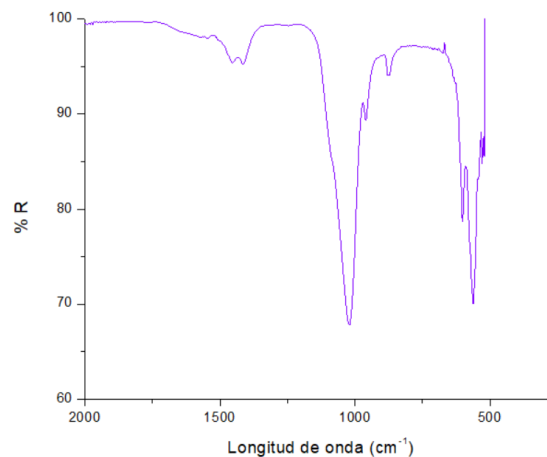


Figura 6.14: Espectro IR Polvos de hidroxiapatita (Tratamiento simultaneo)

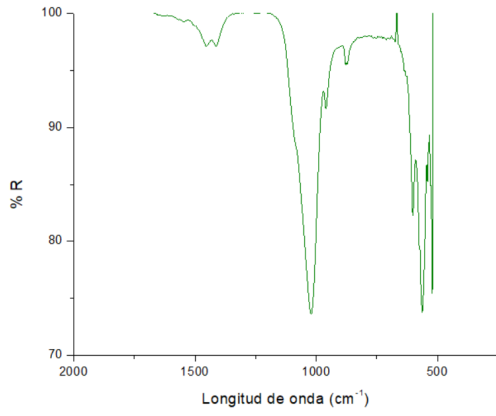


Figura 6.15: Espectro IR de Polvos de hidroxiapatita (Tratamiento continuo)

7 CONCLUSIONES

Se logró establecer condiciones de presión (Pa), tiempo (min) y temperatura ($^{\circ}\text{C}$), para la extracción de lípidos, usando CO_2 SC y etanol. De igual manera se establecieron las condiciones de presión (Pa), tiempo (min) y temperatura ($^{\circ}\text{C}$), para extracción de proteínas usando CO_2 SC y H_2O subcrítica, para una matriz de hueso de fémur bovino.

La presión y temperatura mostraron un efecto significativo sobre el porcentaje de grasa extraída, encontrando que a las condiciones de $T = 125^{\circ}\text{C}$, $P=250$ bar, $t=20$ min, $Q_{\text{EtOH}}=8\text{mL/min}$ y $Q_{\text{CO}_2}=8\text{mL/min}$ se extrae la totalidad de grasa del hueso.

La temperatura tiene efecto significativo sobre el porcentaje de proteína extraída, encontrando que a las condiciones de $T = 150^{\circ}\text{C}$, $P=400$ bar, $t=300$ min, $Q_{\text{H}_2\text{O}}=2\text{mL/min}$ y $Q_{\text{CO}_2}=8\text{mL/min}$.

Las microscopias mostraron que los tratamientos de extracciones supercríticas aplicadas a los polvos de hueso de bovino, extraen exitosamente los lípidos y las proteínas de la matriz ósea, al permitir observar las partículas desde una escala de $2\ \mu\text{m}$.

Los difractogramas presentan que la Hap obtenida de forma simultánea, presentan una mayor definición (picos más definidos y delgados) y el análisis termogravimétrico demuestra se logró obtener un 97.5% del mineral.

- Ahmad, M., McCarthy, M. & Gronowicz, G. (1999): An in Vitro Model for Mineralization of Human Osteoblast-like Cells on Implant Materials. *Biomaterials*. p. 211–20.
- Bäumler, E. R., Carrín, M. E., & Carelli, A. A. (2016). Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent. *Journal of Food Engineering*, 178, 190-197.
- Bessa, L. C., Ferreira, M. C., Rodrigues, C. E., Batista, E. A., & Meirelles, A. J. (2017). Simulation and process design of continuous countercurrent ethanolic extraction of rice bran oil. *Journal of Food Engineering*, 202, 99-113.
- Boskey, Adele L. 2003. Biomineralization: An Overview. *Connective tissue research*. p. 5–9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12952166>.
- Brunner, G. (1994). Topics in Physical Chemistry. An Introduction to Fundament of supercritical Fluids and the Application to separation Process. Gas Extraction. Vol. 4 Ed. Deutsche Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie e.V. New York pp 6,34 y 46.
- Cullity, B. D. (1956). Elements of X-ray Diffraction. 1st. Ed. Addison-Wesley publishing company, inc. Estados Unidos de Norte America, pp 17, 84-88.
- Doremus, R. (1992). Bioceramics. *Journal of Materials Science*. p. 285 - 297.
- Duba, K. S., Casazza, A. A., Mohamed, H. B., Perego, P., & Fiori, L. (2015). Extraction of polyphenols from grape skins and defatted grape seeds using subcritical water: experiments and modeling. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 29-38.
- Espinosa, S. (2001). Procesamiento Supercrítico de Productos Naturales: Modelado, Análisis Y Optimización. 4.29-30.
- Fages, J., Marty, A., Delga, C., Condoret, J., Combes. & Frayssinet. (1994). Use of Supercritical CO₂ for Bone Delipidation. *Biomaterials*. p. 650–656.

- Fernandez-Tresguerres, I., Hernandez, G., Alobera, M., Del Canto, M. & Blanco, L. (2006). Bases Fisiologicas de La Regeneración Osea I. Histologia Y Fisiologia Del Tejido Oseo. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*. p. 32–36.
- Fernigrini, P., Cámara O.R., & Oliva, F. Y. (2008). Síntesis y caracterización de distintas apatitas y su utilizacion como biomaterial. Segundo encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales.
- Ferraz, M. P., Monteiro, F. J, & Manuel C. M. (2004). Hydroxyapatite Nanoparticles *Journal of Applied Biomaterials* **2**(2): 74–80.
- Gallegos Nieto, E. (2013). Análisis de las propiedades mecánicas de andamios de hidroxiapatita utilizados en ingeniería tisular. Tesis de maestria en Ingeniería Mecánica. Universidad Autonoma de San Luis Potosi. San Luis Potosi, México
- García, M., Cabral, F. A., & Correa, H. A. M. (2012). Dióxido de carbono supercrítico y etanol presurizado como solventes en la extracción de compuestos antioxidantes presentes en la piel de mango (*Mangifera indica* L.). *Acta Agronómica*, **61**(5): 85.
- Gañán, N. A. (2014). Extracción y fraccionamiento de biocidas de origen natural mediante el uso de fluidos supercríticos
- García-Garduño, M. V., & Reyes-Gasga, J. (2006). La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, **9**(2).
- Garzon, A., Aguirre, N., & Olaya, J. (2013). Estado del arte en biocompatibilidad de recubrimientos. *Visión electrónica*, **7**(1): 160-177.
- Giraldo-Betancur, A. L., Espinosa-Arbelaez, D. G., del Real-López, A., Millan-Malo, B. M., Rivera-Muñoz, E. M., Gutierrez-Cortez, E., & Rodriguez-Garcia, M. E. (2013). Comparison of physicochemical properties of bio and commercial hydroxyapatite. *Current Applied Physics*, **13**(7): 1383-1390.
- Governa, M., Marchini, G., Brunelli, C., Dall'Antonia, A., & Barisoni, D. (2003). Hydroxyapatite orbital implant covered with fascia lata in post-enucleation eye

- reconstruction. *European Journal of Plastic Surgery*, **26**(7): 331-334.
- Hernández, R., Palma R., & Piña, C. (1999). Hidroxiapatita Y Aplicaciones. *Revista Mexicana de física*. p. 144–147.
- Ibanez, E., Kubátová, A., Señoráns, F. J., Cavero, S., Reglero, G., & Hawthorne, S. B. (2003). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, **51**(2): 375-382.
- Jachmanián, I., Margenat, L., Torres, A. I., & Grompone, M. A. (2006). Estabilidad oxidativa y contenido de tocoferoles en el aceite de canola extraído con CO₂ supercrítico. *Grasas y aceites*, **57**(2).
- Jensen, T., Schou, S., Stavropoulos, A., Terheyden, H., & Holmstrup, P. (2012). Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft: a systematic review. *Clinical oral implants research*, **23**(3): 263-273.
- Kang, C. K., & Lee, Y. S. (2012). Carbohydrate polymer grafting on stainless steel surface and its biocompatibility study. *Journal of industrial and Engineering Chemistry*, **18**(5): 1670-1675.
- Karsenty, G. (1999). The genetic transformation of bone biology. *Genes & development*, **13**(23): 3037-3051.
- Levit, N., & Tepper, G. (2004). Supercritical CO₂ -Assisted Electrospinning. p. 329–333.
- Liadakis, G. (2003). Extraction Optimization in Food Engineering. Ed. Constantina Tzia. Athens, greece. p. 30-33
- Lopez, A. S., Mirza-Rosca, J., Vasilescu, E., Drob, P., Raducanu, D., & Angelescu, L. (2004). Technical and functional properties of some biocompatible thin films. *Materials chemistry and physics*, **86**(1): 38-43.
- Martínez-Valencia, A. B., Esparza-Ponce, H. E., & Ortiz-Landeros, J. (2008). Caracterización estructural y morfológica de hidroxiapatita nanoestructurada: estudio comparativo de diferentes métodos de síntesis. *Superficies y*

vacío, **21**(4): 18-21.

- Norton, J., Malik, K. R., Darr, J. A., & Rehman, I. (2006). Recent developments in processing and surface modification of hydroxyapatite. *Advances in applied ceramics*, **105**(3): 113-139.
- Ogawa, A. & Plepis, G. (2004). Liberación In Vitro de Cloridrato de Ciprofloxacina em Compósitos Hidroxiapatita:Colágeno. *Journal of Raman Spectroscopy*. p. 21–26.
- O'Hare, P., Meenan, B. J., Burke, G. A., Byrne, G., Dowling, D., & Hunt, J. A. (2010). Biological responses to hydroxyapatite surfaces deposited via a co-incident microblasting technique. *Biomaterials*, **31**(3): 515-522.
- Orlovskii, V. P., Komlev, V. S., & Barinov, S. M. (2002). Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics. *Inorganic Materials*, **38**(10): 973-984.
- Orozco, J.C, Zuluaga, I. M., Forero, P., Arango, J. & Parra, E. (2013). Síntesis y caracterización de la Hidroxiapatita natural obtenida del hueso de cerdo. *Revista Colombiana de materiales*. p.165–171.
- Ozawa, M., & Suzuki, S. (2002). Microstructural development of natural hydroxyapatite originated from fish-bone waste through heat treatment. *Journal of the American Ceramic Society*, **85**(5): 1315-1317.
- Paul, W., Nesamony, J., & Sharma, C. P. (2002). Delivery of insulin from hydroxyapatite ceramic microspheres: Preliminary in vivo studies. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **61**(4): 660-662.
- Perko, T., Ravber, M., Knez, Ž., & Škerget, M. (2016). Extraction of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa* L.) with subcritical water. *Technologica Acta*, 29.
- Piña, M.C. (2007). Los Biomateriales Y Sus Aplicaciones. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. p. 55–58.
- Ramirez-Gutierrez, C. F., Palechor-Ocampo, A. F., Londoño-Restrepo, S. M., Millán-Malo, B. M., & Rodríguez-García, M. E. (2016). Cooling rate effects on thermal, structural, and microstructural properties of bio-hydroxyapatite obtained from bovine bone. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied*

Biomaterials, **104**(2): 339-344.

- Rangel, N. A., de Alva, H. E., Romero, J., Rivera, J. L., Álvarez, A., & García, E. (2007). Síntesis y caracterización de materiales reforzados (“composites”) de poliuretano poroso/hidroxiapatita. *Revista iberoamericana de Polímeros*, **8**(2): 99-111.
- Rho, J. Y., Kuhn-Spearing, L., & Zioupos, P. (1998). Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical engineering and physics*, **20**(2): 92-102.
- Rodil, S. E. (2009). Modificación superficial de biomateriales metálicos. *Revista latinoamericana de metalurgia y materiales*, **29**(2): 67-83.
- Rodrigues, C. E., Longo, N. M., Silva, C. C., Aracava, K. K., & Garavazo, B. R. (2011). Ethanolic extraction of soybean oil: oil solubility equilibria and kinetic studies. *Chem. Eng. Trans.*, **24**, 811-816.
- Rodrigues, C. E., Gonçalves, C. B., Marcon, E. C., Batista, E. A., & Meirelles, A. J. (2014). Deacidification of rice bran oil by liquid–liquid extraction using a renewable solvent. *Separation and Purification Technology*, **132**, 84-92.
- Sequeda, L. G., Díaz, J. M., Gutiérrez, S. J., Perdomo, S. J., & Gómez, O. L. (2012). Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, **41**(1): 50-66.
- Sereewatthanawut, I., Prapintip, S., Watchirarujj, K., Goto, M., Sasaki, M., & Shotipruk, A. (2008). Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis. *Bioresource technology*, **99**(3): 555-561.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). Principios de análisis instrumental (No. 543.4/ 5). McGraw-Hill Interamericana de España,
- Tresguerres, J.A. F. (2005) Fisiología humana. 3rd. Ed. McGraw-Hill Interamericana. pp 290-310
- Velasco, R. J., Villada, H. S., & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información tecnológica*, **18**(1): 53-66.

- Velásquez, A. (2008). La tecnología de fluidos supercríticos, un proceso limpio para el sector industrial. *Tecnologías para la industria alimentaria*, **1**(3): 98-104.
- Wahl, D. A., & Czernuszka, J. T. (2006). Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *European Cells and Materials* **11**, 43-56.
- Wang, H., Li, Y., Zuo, Y., Li, J., Ma, S., & Cheng, L. (2007). Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, **28**(22): 3338-3348.
- Wang, L., & Nancollas, G. H. (2008). Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. *Chemical reviews*, **108**(11): 4628-4669.
- Xiaoying, L., Yongbin, F., Dachun, G., Wei, C., 2007. Preparation and characterization of natural hydroxyapatite from animal hard.
- Yamamoto, H., Kim, E. J., Cho, S. W., & Jung, H. S. (2003). Analysis of tooth formation by reaggregated dental mesenchyme from mouse embryo. *Journal of electron microscopy*, **52**(6): 559-566.
- Yang, Y., Bowadt, S., Hawthorne, S. B., & Miller, D. J. (1995). Subcritical water extraction of polychlorinated biphenyls from soil and sediment. *Analytical Chemistry*, **67**(24): 4571-4576.
- Yedro, F. M., Grénman, H., Rissanen, J. V., Salmi, T., García-Serna, J., & Cocero, M. J. (2017). Chemical composition and extraction kinetics of Holm oak (*Quercus ilex*) hemicelluloses using subcritical water. *The Journal of Supercritical Fluids*, **129**, 56-62.