

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

**PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN CIENCIAS
AMBIENTALES**

**PROPUESTA DE PROYECTO A REALIZAR EN EL PROGRAMA DE
DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Título del proyecto:

**Alternativas de aprovechamiento de residuos biológicos para el
desarrollo de materiales basados en hidroxiapatita aplicados al ambiente y
salud**

Aspirante:

M.T.G.A. Hilda Guadalupe Cisneros Ontiveros

Directores:

Dr. Nahúm Andrés Medellín Castillo

Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México

Dr. Juan Carlos Moreno Piraján

Universidad de los Andes, Colombia

Fecha: Noviembre 2021

1. Introducción

1.1 Hidroxiapatita

La hidroxiapatita (HAP) es un material biológico formado por fosfato de calcio cristalino, de fórmula ideal $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, este biomaterial es ampliamente usado en áreas médicas, agrícolas, industriales entre otras. La HAP, o sus precursores, también se pueden encontrar en exoesqueletos como el de la estrella de mar *Mellita sp*, en los corales marinos, en los esqueletos de los vertebrados, en el esmalte y dentina de los dientes, en especies de bovinos y porcinos (García & Reyes, 2006).

Sin embargo, la estructura ósea contiene otros minerales debido a su estructura, ya que permite diferentes sustituciones, por lo que se conoce, la HAP biológica puede ser deficiente en calcio (Ca^+), sodio (Na^+), magnesio (Mg^{2+}), fosfato ácido (HPO_4), potasio (K^+), carbonatos (CO_3^{2-}), fluoruro (F^-) y cloruro (Cl^-) que son los elementos minoritarios asociados con las apatitas biológicas; estroncio (Sr^{2+}), bario (Ba^{2+}) y zinc (Zn^+) entre otros, están incluidos como elementos traza. Estos elementos minoritarios y traza pueden estar enlazados en algún punto de la red. Estos minerales, cumplen funciones específicas, especialmente minerales como el Mg y el K, ayudan a mejorar y mantener la densidad ósea y el Zn es un factor importante en la mineralización ósea y la estructura de colágeno (Campa-Molina et al., 2007).

1.2 Residuos biológicos como fuente de HAP

En cuanto a los métodos para su obtención, la HAP se puede obtener de forma sintética o a partir de fuentes biológicas, donde la obtenida de forma sintética se prepara usando diferentes tipos de reactivos y técnicas (Rivera et al., 2010).

Según su origen se puede obtener hidroxiapatita a partir de residuos animales y vegetales. De acuerdo con la Tabla 1, se muestran residuos biológicos como fuente de hidroxiapatita que fueron extraídos y caracterizados.

Entre los de origen animal se pueden encontrar en restos óseos mamíferos, cáscara de huevo de aves, restos coralinos y en espinas y escamas de pescados (Bémudez-García et al., 2021)

Tabla 1 Residuos biológicos fuentes de obtención de hidroxiapatita

Residuo	Referencia
Restos óseos de Bovino	Khan, 2020
Restos óseos de Porcino	Ramirez-Gutierrez, 2017
Restos óseos de Cámelico	Gashtasbi, 2020
Restos óseos de Equino	Jang, 2014
Residuos de cáscara de huevo de gallina	Arboleda, 2016
Residuos de cáscara de huevo de avestruz	Malla, 2020
Residuos de espina de pescado (salmón, carpa, anchoa japonesa, sardina, blanquillo, atún)	Shi, 2018
Residuos de escama de pescado (tilapia)	Huan, 2011
Residuos de corales (ostras, mejillones, almejas, estrella de mar)	Agbeboh, 2020

Actualmente, la aplicación de la HAP procedente de una variedad de residuos biológicos ha sido uno de los aprovechamientos más eficaces contra la problemática de acumulación de desechos biológicos y los riesgos a la salud, debido al foco de infección sobre la putrefacción de dichos desechos.

1.3 Carbonizado de hueso

Desde hace tiempo, el carbonizado de hueso ha sido considerado como un potencial adsorbente para la remoción de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Cisneros-Ontiveros et al, 2020; Leyva-Ramos et al., 2015; Medellín-Castillo et al., 2020), así como en el tratamiento de aguas residuales. La obtención de carbonizado de hueso es a partir de residuos biológicos, tales como los huesos de animales (bovinos, peces, etc.) e inclusive de corales (Rivera et al., 2010), por medio de una pirólisis en una atmósfera inerte a temperaturas altas entre 400 a 800°C (Rojas-Mayorga et al, 2015; Alkurdi S. S. A. et al., 2020) durante 2 a 4 horas. El carbonizado que se obtiene por este proceso está compuesto esencialmente por un 70 a 76% en peso de hidroxiapatita, 9 a 11% en carbón y de 7 a 9% de carbonato de calcio. La HAP está presente en el carbonizado de hueso junto con las fibras de colágeno las cuales forman la matriz ósea. Para la extracción de este constituyente, es necesario encontrar técnicas que permitan eliminar la fase orgánica sin degradar la fase mineral o inorgánica (HAP) (Campa-Molina et a., 2007).

Kusrini & Sontang (2012) usaron el fémur del bovino (con una edad de 2 años 9 meses), al cual se le remueve todo el tejido visible y las sustancias que están en la superficie del hueso, donde luego se hace un proceso de desgrasado en agua hirviendo seguida por un secado al ambiente, por último, la muestra se sinteriza en

vacío con temperaturas entre los 500 y 1400 °C durante 2 a 4 horas y se deja enfriar en vacío y lentamente, y por último se convierte en polvo.

1.4 Biofertilizantes

La HAP es un biomaterial con una serie de aplicaciones en el campo de investigación, recientemente se ha reportado el potencial de los nanofertilizantes para incrementar rendimientos en los cultivos. Flores-Hernández et al. (2021) realizaron una síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita (nHAP) en donde evaluaron su eficacia como fertilizante natural y el efecto catalizador en el crecimiento en plántulas de rábano (*Raphanus sativas*), debido a que la HAP tiene un alto contenido de fósforo (P) y calcio (Ca), nutrientes importantes para el crecimiento biológico de especies vegetales. Dichos autores produjeron las nHAP de manera sintética a partir de soluciones de hidróxido de calcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ y ácido ortofosfórico (H_3PO_4). Los efectos observados fueron una estimulación significativa en la producción de biomasa, con concentraciones altas de nHAP, por otro lado, algunas variantes como germinación y vigor fueron afectadas. Por lo que los autores recomiendan la investigación más a profundidad sobre el efecto del crecimiento sobre diferentes semillas y con concentraciones bajas de nHAP.

De acuerdo con Marchiol et al. (2019) la principal ventaja de usar HAP como fertilizante con respecto a otros materiales, es que son ampliamente reconocidos por su biocompatibilidad y biodegradabilidad intrínseca, además, de la ausencia de metales pesados en su composición. Por lo tanto, cuando se considera su aplicación en campo abierto, el perfil biológico seguro de la HAP no debe plantear ninguna preocupación sobre la salud humana y ambiental.

Estudios recientes, trataron de evidenciar el posible efecto fitotóxico de las nano partículas de hidroxiapatita, sin embargo, sus resultados indican que este efecto es nulo para diferentes cultivos (Flores-Hernández et al., 2021; Marchiol et al., 2019).

Bala et al. (2014) observaron un aumento de la tasa de crecimiento de la planta garbanzo (*Cicer arietinum*) con respecto al control, a lo cual también comprobaron mediante micrografías High Resolution Transmission Electron Microscopy (HRTEM, por sus siglas en inglés) trazas de las nano partículas con 1 mg mL^{-1} , asumiendo que la mayor parte fue utilizada por la planta en sus procesos metabólicos. Por otro lado, Marchiol et al. (2019), reportaron que la HAP no tuvo efectos fitotóxicos en plantas de *S. lycopersicum* cultivadas en hidroponía. Sus resultados muestran que el porcentaje de germinación no se vio afectado por ninguna concentración aplicada, mientras que la elongación de raíz si se vio claramente afectada, siendo el mejor tratamiento a 500 mg L^{-1} con un aumento del 97% con respecto al control. Por su parte, Ortiz et al. (2017) indicaron que la HAP en solución no tiene efectos tóxicos en la germinación de semillas de *L. sativa*.

De manera contraria, Flores-Hernández et al. (2021) describen un efecto adverso significativo en la germinación y vigor a concentraciones entre 500 a 1000 mg L^{-1} , dando lugar un comportamiento inhibitor ocasionado por la presencia excesiva de HAP. Las diferencias antes señaladas pueden estar relacionadas con el tamaño y la morfología de las partículas utilizadas, Bala et al. (2014) utilizaron HAP en forma de varilla con una longitud entre 40 y 80 nm y un diámetro entre 15 a

30 nm, mientras que Marchiol et al. (2019) utilizaron HAP con forma de platos irregulares con tamaños entre 94 a 163 nm.

1.5 Injertos dentales

La HAP en los tejidos mineralizados reviste una gran importancia ya que se ha demostrado que es un material biocompatible, con aplicación biomédica en Odontología, Ortopedia y Cirugía Máxilofacial (Rivera et al., 2010). Cuando se trata de remediar problemas óseos como los causados por defectos congénitos o los resultantes de infecciones, traumas o resección de tumores óseos, se emplean injertos o implantes por su bajo costo. Un material que se ha propuesto para la realización de xenoimplantes (implantes se obtiene de individuos de especie diferente a la receptora) para tejido óseo es la matriz ósea proveniente de hueso de bovino. Esta matriz está constituida por cristales nanométricos de hidroxiapatita depositados sobre colágena, composición que es igual en todos los mamíferos (Piña-Barba et al., 2006). Para que un material pueda ser empleado como implante, se requiere que cumpla con una serie de requisitos marcados en las normas internacionales como las de American Society for Testing and Materials (ASTM) (1999). De acuerdo a la caracterización fisicoquímica, algunos de los requisitos marcados por la ASTM para un xenoimplante son la cantidad de calcio (Ca) y fósforo (P) y la relación Ca/P de la muestra determinada mediante análisis químico fundamental. Para hueso se espera obtener una relación de Ca/P entre 1.4 y 4.0; la concentración de elementos considerados altamente tóxicos como son arsénico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (Pb) no deben sobrepasar los siguientes límites: 3 ppm (partes por millón), 5 ppm, 5 ppm y 30 ppm, respectivamente. Estas

relaciones se pueden estimar mediante espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (Brown & Constantz 1994); también se pueden emplear técnicas de caracterización como difracción de rayos X (DRX); Análisis de Infrarrojo (IR), análisis termogravimétrico (TGA), análisis termodiferencial (ADT), entre otras.

1.6 Biomaterial adsorbente (composito)

Otra de las aplicaciones de la HAP como constituyente de los carbonizados de hueso es su empleo como biomaterial adsorbente para la remoción de contaminantes en procesos en el tratamiento de agua.

Medellín-Castillo et al., (2020) elaboraron un plan de manejo sobre el aprovechamiento de una especie exótica invasora, pez diablo (también conocido como pez pleco), de origen sudamericano, que a partir del 2009 su presencia se convirtió en una problemática ecosistémica en el sur de México, debido a una serie de riesgos al ambiente y salud ocasionado por su excesiva presencia. Dicho aprovechamiento fue llevado a cabo con los residuos óseos, debido a que esta especie invasora cuenta con porcentaje en peso de hueso mayor con respecto a su tejido, es por ello por lo que su eficiencia de rendimiento de carbonizado de hueso es viable. Los autores realizaron la remoción de fluoruros y cadmio del agua; obtuvieron porcentajes de remoción de los contaminantes por encima del 90%. Realizando una furtiva caracterización del carbonizado de sus propiedades de adsorción y textura, determinaron que la HAP juega un papel importante en el mecanismo de adsorción de los contaminantes.

Los biopolímeros se derivan de un conjunto diverso de polisacáridos, proteínas, lípidos, polifenoles y polímeros especiales producidos por bacterias, hongos, plantas y animales (Kaplan, 1998). El término biopolímero se refiere a moléculas de cadena larga de origen natural, pero también a materiales que se han derivado de estos monómeros de base biológica (Yates y Barlow, 2013). Los biopolímeros también denominados polímeros naturales, son los polímeros producidos durante el crecimiento de cualquier organismo vivo y han surgido como una alternativa potencial al uso de polímeros convencionales (Vijayendra y Shamala, 2014). Los biopolímeros son atractivos por tener estructuras únicas y propiedades características, como abundancia natural, biocompatibilidad, biodegradabilidad, excelentes condiciones para ser procesados, nula toxicidad, estabilidad, son seguros de usar, tienen naturaleza sostenible, renovable y lo que es más importante son amigables con el ambiente (Jian et al., 2020). Los polímeros naturales tienen propiedades de barrera limitadas y propiedades mecánicas débiles (Khan et al., 2012).

Loja-Flores (2020) obtuvo un polímero biodegradable a partir del alginato de sodio extraído de la pared celular del alga para *Sargassum Ecuadoreanum*, especie acuática en las zonas tropicales y subtropicales debido a su número y gran biomasa generada que adquirió el nombre de sargazo en las orillas del mar, costas importantes en el Mar de Ecuador.

Los biopolímeros pueden ser mezclados con otros materiales para ofrecer propiedades compensatorias (Don et al., 2005) a fin de contrarrestar estas propiedades, existe la posibilidad de combinar estos materiales y cuyo resultado se

le conoce como compositos. Los compositos son la combinación de dos o más materiales de tal manera que se logran ciertas propiedades mejoradas o deseadas, en un composito las fases dispersas se distribuyen en un medio continuo llamado matriz (Balasubramanian, 2014).

De acuerdo con lo anterior, se puede resumir que las investigaciones que abordan la aplicación de la hidroxiapatita biológica tienen un enfoque en su aprovechamiento en el mejoramiento de suelos como biofertilizante, también es una material alternativo clave en la biocompatibilidad como implante dental y regeneración de hueso, y finalmente es un potencial biomaterial adsorbente de contaminantes en el proceso de tratamiento de aguas residuales.

Es por ello por lo que el objetivo de este trabajo es sintetizar materiales en base a hidroxiapatita extraída o sintetizada de diversos residuos biológicos para su empleo en aplicaciones ambientales y de salud. Se sintetizarán nanopartículas de hidroxiapatita a partir de diversos residuos biológicos como los huesos de animales para su empleo en el mejoramiento de suelos de cultivos de alimentos. En el área de biomédica, la hidroxiapatita será elaborada cumpliendo los requisitos de la ASTM y se probará en injertos dentales. Por último, en el tratamiento de agua, se prepararán materiales en base a hidroxiapatita, tales como los biocompositos, a partir de biopolímeros naturales extraídos de diversos residuos.

2. Justificación

El exceso del uso de fertilizantes fosforados sintéticos en cultivos del bajo en México debido a la alta demanda de alimentos en los últimos 50 años, han generado

una explotación sin precedente de los recursos naturales para la obtención de fósforo, nitrógeno y otros micronutrientes. Del mismo modo, el mejoramiento en los cultivos ha promovido una demanda creciente de agroquímicos tanto de fertilizantes como de plaguicidas y su uso de forma indiscriminada ha llevado a impactar de forma negativa el ambiente. El impacto ambiental señalado es evidente en la degradación y contaminación de los suelos agrícolas, lo que disminuye su capacidad de producción y, además, la incorporación de este tipo de compuestos también altera la calidad de cuerpos de agua. Con la realización del presente estudio se pretende aprovechar la hidroxiapatita (HAP) proveniente de los residuos biológicos como materia prima para la extracción de HAP, a fin de evaluar una posible mejoría en el rendimiento de los cultivos de manera más viable para el ambiente. Siendo la HAP un biomaterial con potencial uso en la agricultura, en este trabajo se evaluará sus propiedades fisicoquímicas distintas y su efecto en los procesos metabólicos de las plantas a evaluar. De tal manera, para un aprovechamiento alternativo en este trabajo, se caracterizará la HAP de acuerdo a los requisitos internacionales para ser un material biocompatible como injerto dental. Así mismo se utilizará la HAP existente en los residuos óseos como un biomaterial adsorbente, como el carbonizado de hueso, utilizando el método de cubierta de biopolímero para la remoción de contaminantes en solución acuosa.

3. Objetivo

3.1 Objetivo general

Aprovechar la hidroxiapatita de los residuos biológicos como un biofertilizante en cultivos, injerto dental y biomaterial adsorbente de contaminantes en sistemas acuosos.

3.2 Objetivos específicos

1. Extracción de la HAP a partir de restos naturales biológicos.
2. Elaborar el carbonizado de hueso a partir de residuos óseos de animales mediante el método de pirolisis para la extracción de la hidroxiapatita (HAP).
3. Caracterizar la HAP natural extraída de acuerdo a los parámetros internacionales ASTM para su empleo en injertos dentales.
4. Caracterizar el carbonizado de hueso mediante MEB, IR y RDX para determinar el rendimiento, estado cristalino y los grupos funcionales de la HAP.
5. Elaboración del biofertilizante a partir de los residuos biológicos.
6. Determinar el efecto de la aplicación de la HAP sobre los procesos metabólicos de las semillas.
7. Evaluar la diferencia en respuesta del vigor de la semilla a la aplicación de HAP sobre el control.
8. Evaluar si a diferentes dosis aplicadas de HAP sobre las semillas se obtiene un efecto promotor o fitotóxico en procesos relacionados con la germinación y el crecimiento de las plántulas.

9. Sintetizar el biomaterial adsorbente utilizando como soporte las partículas de carbonizado de hueso envueltas del polímero basado en sargazo
10. Evaluar la capacidad de adsorción de contaminantes en sistemas acuosos a través de los biomateriales seleccionados.
11. Evaluar la eficiencia de los biomateriales sintetizados en plantas mediante una prueba piloto en sistema hidropónico.
12. Caracterizar los biomateriales por medio de técnicas analíticas de microscopia electrónica de barrido (MEB), fisisorción de nitrógeno (BET), espectroscopia de infrarrojo (FT-IR), análisis termogravimétrico (TGA), distribución de carga y punto de carga cero (PCC).

4. Metodología

4.1. Elaboración del carbonizado de hueso

El proceso descrito comprende etapas de limpieza primaria del material de partida, desgrasado, desproteinización y opcionalmente eliminación de carbonatas. El proceso de la invención permite la obtención de hidroxiapatita con características físico-químicas comparables a hidroxiapatitas comerciales, teniendo también los elementos que caracterizan naturalmente al tejido óseo.

Una vez obtenidos los huesos, se realizara una limpieza de estos que consiste en la remoción de grasa y tejido restante adherida a los huesos. Se colocaran los huesos, piel, aletas en una olla sobre una parrilla de calentamiento, se agregaran 2 L de una mezcla de peróxido de hidrogeno y agua desionizada (1:6), se mantendrán en ebullición durante 2 h. Transcurrido este tiempo, la mayor cantidad de materia orgánica se removerá de los huesos. Las muestras de hueso se secaran durante 24 h en un horno a 40°C, se trituraran y se tamizaran para obtener un tamaño de partícula de ≈ 1 mm. Estas muestras de hueso se usaran para la preparación de carbonizado de hueso mediante un proceso de pirolisis (Rojas-Mayorga et al., 2013). Se realizará una calcinación de los huesos en un horno horizontal tubular estableciendo variables de temperatura de 800 a 1000 °C variando durante 2 a 3h se utilizará una rampa de temperatura de 10 °C/min en una atmósfera limitada de oxígeno.

4.2. Obtención de Hidroxiapatita

La hidroxiapatita será extraída de diversos residuos naturales ricos en calcio y fósforo, tales como, coral, cascará de huevo, huesos de animales entre otros.

La eliminación de grasa se empaquetará en polvo en papel filtro, se agregará éter de petróleo y someterlo a calentamiento a 30°C durante 9 horas, se dejará en polvo a temperatura ambiente por 15 h y se someterá a calentamiento a 30 °C durante 9 h, repitiendo el procedimiento dos veces más, posteriormente se eliminará el exceso de solvente, se secará a 70 °C durante 5 h, se empaquetará el polvo obtenido en papel filtro y se agregará acetona, se someterá a ultrasonido durante 2 h con intervalos de reposo de media hora, después se eliminará la acetona y se secará a 70°C durante 5 horas.

La desproteinización del polvo mediante las subetapas se realizará sometiendo el hueso en polvo a calentamiento a partir de temperatura ambiente hasta 400°C a una razón de 0.4°C /min y se mantendrá el calentamiento por 3 horas a la temperatura final, y finalmente se incrementará la temperatura de 400°C a 900°C a una razón 1.4°C /min, se mantendrá durante 3 h a la temperatura final dejando enfriar a temperatura ambiente.

4.3. Caracterización de la HAP como injerto dental

Entre los requisitos físico-químicos marcados por ASTM para el estudio de un xenoimplante, se deben considerar los siguientes parámetros:

1. Cantidad de calcio (Ca) y fósforo (P) y la relación Ca/P de la muestra determinada mediante análisis químico fundamental. Para hueso se espera obtener: $1.4 < \text{Ca/P} < 4.0$.

2. Concentración de elementos considerados altamente tóxicos como son arsénico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (Pb) cuya concentración en un material de implante no debe sobrepasar los siguientes límites: 3 ppm (partes por millón) para As, 5 ppm para Cd, 5 ppm para Hg, 30 ppm para Pb.⁷ Esto se hará mediante espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).
3. Composición del material, en este caso por hidroxiapatita, carbonatos y fosfatos de calcio puros, determinado por difracción de rayos X (DRX).
4. Grupos funcionales presentes en el material, deben identificarse por Análisis de Infrarrojo (IR).
5. Contenido orgánico del material, el cual se determina por análisis termogravimétrico (TGA) y análisis termodiferencial (ADT).

Además de los anteriores requisitos, se determinará el intervalo de tamaño de poros por microscopía electrónica de barrido (MEB).

4.4. Elaboración del biofertilizante

Las suspensiones se prepararán con partículas de carbonizado de huesos de un tamaño entre 10 y 45 nm. La concentración inicial será de 5000 mg L⁻¹, en suspensión en agua desionizada estéril y dispersada durante 30 min con un sonicador. La suspensión se diluirá y se aplicarán seis experimentos, los cuales serán: control (agua destilada, (E1); 1 (E2); 10 (E3); 50 (E4); 200 (E5) y 500 mg L⁻¹ (E6).

4.5. Germinación de semillas y crecimiento de plántulas

En cada tratamiento se utilizarán 50 semillas de jitomate y 50 semillas de trigo las cuales se colocarán en cajas Petri (100 x 15 mm), sin división. Los tratamientos se aplicarán una sola vez durante la etapa de imbibición, para lo cual se añadirán 10 mL de suspensión de nHAp con una pipeta, en cada uno de los tratamientos. Para luego colocar las cajas Petri durante 4 h en una cámara de crecimiento para plantas [Equitec EGCS 3S, 301 3SHR (Equitek)] (ver Figura 1), a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Completado el período de imbibición de las semillas, se sembrarán tres réplicas de 25 semillas por tratamiento en papel Anchor, humedecido con agua destilada, las semillas se colocarán de forma horizontal, sobre el papel, con el embrión ubicado hacia abajo, enseguida se procederá a humedecer otro papel del mismo tamaño para cubrir las semillas. Posteriormente, se plegarán en un rollo de 4 cm de ancho, que se colocarán en cestas de polietileno de 20 x 45 cm de ancho y alto, y se regresarán a la cámara de crecimiento durante siete días bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodo (Flores-Hernández et al., 2021).



Figura 1. Cámara de crecimiento para plantas

4.6. Parámetros evaluados durante el experimento

El bioensayo se desarrollará de acuerdo con las normas del ISTA (2004), las cuales consideran los siguientes parámetros: porcentaje de vigor y de germinación, longitud de plúmula y radícula (cm), al finalizar el bioensayo se determinará la acumulación de biomasa seca en miligramos por plántula.

4.7. Vigor de semillas (V%)

Al cuarto día después de la siembra, se realizará el primer conteo para la toma de datos de plántulas normales (plántulas que tienen bien desarrolladas la raíz y la plúmula, con desarrollo total de 2.0 cm en promedio). Para determinar el vigor de la semilla (Ec. 2), se expresará el resultado en porcentaje.

$$\text{Vigor de semilla (V\%)} = \frac{\text{plántulas normales}}{\text{número de semillas incubadas}} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

4.8. Porcentaje de germinación (G%)

Se determinará a los siete días después de la siembra en el segundo conteo, para lo cual se considerará el conteo total de plántulas normales a partir de la Ecuación 3 y el resultado se expresará en porcentaje.

$$\text{Porcentaje de germinación (G\%)} = \frac{\text{número de semillas germinadas}}{\text{número de semillas incubadas}} \times 100 \quad \text{Ec. 3}$$

4.9. Longitud de plúmula y radícula

La longitud de la plúmula (cm) se medirá desde la intersección raíz-hipocótilo hasta la base del cotiledón (longitud de plúmula). Mientras que la longitud de la radícula (cm) se medirá desde la base del hipocótilo hasta el ápice de la radícula (ver Figura 2).

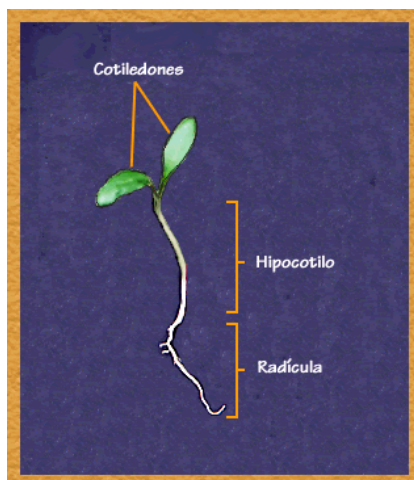


Figura 2. Descripción de las partes de una plántula.

4.10. *Peso seco (miligramos de plántula)*

Las plántulas normales de cada unidad experimental se colocarán en bolsas de papel estraza perforadas e identificadas, que después se colocarán en una estufa de secado, a temperatura de 72°C durante 24 h. Al finalizar el tiempo se registrará el peso de las muestras en una balanza analítica para determinar el valor de la biomasa seca y se reportará en miligramos por plántula.

4.11. *Elaboración del biopolímero*

La extracción de alginato a través de sargazo se llevará a cabo en fases, primero, se eliminará la humedad a temperatura ambiente, después esta biomasa será triturada con una licuadora convencional. Posteriormente, se seguirán los parámetros establecidos por D. Arvizu (1993), en donde se llevará a cabo una hidratación realizado con formaldehído al 0.1 % por gramo de alga para la eliminación de compuestos fenólicos, después la pre-extracción se realizará un intercambio iónico con ácido clorhídrico para transformar en ácido alginato todas las sales de alginato. Posteriormente la extracción se llevará la solución anterior a un

pH de 10 usando una solución de bicarbonato al 10% y se dejará reposar. Finalmente se filtrará al vacío.

4.12. *Síntesis de biocompositos*

La solución de quitosano (3% p/v) se preparará agregando 1.5 g de quitosano en 50 mL de solución de ácido acético (5% v/v), manteniendo en agitación magnética por 12 h. Una cantidad de 4.2 g de Carbonizado de hueso se pesará y se incorporará en la solución de quitosano, manteniendo en agitación durante 30 min. La síntesis de los biomateriales se realizará por el método de gelación iónica que consistirá en gotear la solución quitosano-carbonizado de hueso (relación 1:3) por medio de una bomba peristáltica en soluciones de TPP a diferentes concentraciones (1, 3 y 5% p/v). Al término de la síntesis los biomateriales resultantes se mantuvieron en la en la solución de TPP con agitación continua a 80 rpm en lapsos de 2, 4 y 6 h a temperatura ambiente. Al concluir la agitación, los biomateriales sintetizados se retiraron de la solución de TPP y se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de TPP. Finalmente, los biomateriales fueron secados a 40 °C en una estufa durante 48 h (Flores-Rojas et al., 2020).

4.13. *Isotermas de adsorción de contaminantes sobre el biomaterial.*

Los datos del equilibrio de adsorción de contaminantes en solución acuosa sobre los carbonizados de hueso se obtendrán en adsorbedores de lote, se someterá en contacto 0.1 g del carbonizado de hueso a diferentes concentraciones del contaminante durante 7 días en tubos falcon de 40 mL de solución a una constante temperatura y a diferentes pH iguales a 5, 7 y 9.

Las capacidades de adsorción de los contaminantes, q , en los carbonizados de hueso se calculará por medio de un balance de masa de acuerdo con la siguiente ecuación 4:

$$q = \frac{V(C_0 - C_f)}{m} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde:

C_0 = Concentración inicial del contaminante, mg/L

C_f = Concentración final del contaminante, mg/L

m = Masa del material adsorbente, g

q = Masa de fluoruro adsorbido por unidad de masa de adsorbente, mg/g

V = Volumen de la solución, L

4.14. *Determinación de propiedades de textura y fisicoquímicas de las partículas de biomaterial adsorbente*

- Fracción soluble se determinará la relación entre la masa perdida por el biomaterial al sumergirse en agua y la masa inicial del biomaterial seco a peso constante antes de ser sumergido.
- Análisis por fisisorción de Nitrógeno; se calculará el área específica, volumen y diámetro de los poros.
- Punto de Carga Cero; se medirá la carga superficial neta neutra de la muestra, de acuerdo con el pH de la superficie.
- Determinación de sitios activos; se calculará la concentración de sitios ácidos de la superficie de la muestra neutralizando con solución de 0.01N

de NaOH y sitios básicos neutralizando con una solución de 0.01M de HCl.

- Caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB); se analizará en las micrografías de cada muestra el porcentaje en peso y atómico de los elementos que lo componen y de las partículas que logre adsorber.
- Caracterización por espectroscopia infrarroja (FT-IR); se identificarán los grupos funcionales en la muestra correspondientes a la HAP.
- Análisis Termogravimétrico (TGA); se determinará la variación y la velocidad de pérdida de masa al someterla a una calcinación. Para identificar las etapas de la descomposición, sublimación, reducción, desorción, absorción y vaporización de la muestra.
- Análisis por difracción de Rayos X (DRX); se determinará la fase cristalina de la muestra, en este caso identificar la HAP en la muestra.

5. Productos o resultados esperados

- Material carbonizado a partir de restos óseos de animales
- Extracción de hidroxiapatita de restos naturales ricos en calcio y fosforo
- Caracterización de la hidroxiapatita de acuerdo a la ASTM para su empleo en injertos dentales
- Biofertilizante a partir del carbonizado de hueso y sus subproductos
- Efecto promotor o fitotóxico en los procesos metabólicos en las plantas expuestas al biofertilizante (nano partículas de hidroxiapatita)
- Composito de biomaterial (carbonizado de hueso) y biopolímero natural (sargazo)
- Efecto de pH en la capacidad de adsorción del composito sobre sistemas acuosos.
- Caracterización fisicoquímica y de textura de las nanopartículas de HAP y los compositos (biomaterial y biopolímero)
- Difusión de la investigación en al menos dos Congresos Nacionales y uno Internacional.
- Tesis de Doctorado en Ciencias Ambientales
- Publicación de al menos tres artículos en revista científicas internacionales indizadas
- Estancia de investigación en la Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia, para la síntesis y caracterización de los biomateriales de HAP como biofertilizante, injerto dental y composito.

- Colaboración con el investigador Alessandro Erto de la Universidad Nápoles Federico II para el análisis del equilibrio de adsorción del carbonizado de hueso encapsulado de biopolímero.

6. Referencias

- Agbeboh NI, Oladele IO, Daramola OO, Adediran AA, Olasukanmi OO, Tanimola MO. (2020) Environmentally sustainable processes for the synthesis of hydroxyapatite. *Heliyon*;6(4):e03765.
- Alkurdi, S. S. A., Al-Juboori, R. A., Bundschuh, J., Bowtell, L., & McKnight, S. (2020). Effect of pyrolysis conditions on bone char characterization and its ability for arsenic and fluoride removal. *Environmental Pollution*, 262, 114221. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114221>
- American Society for Testing and Materials (ASTM) (1999) Standard Specification for Composition of Anorganic Bone for Surgical Implants. Annual Book of ASTM Standards, F 1581-99. USA; 13.01. 893-95
- Arvizu, D. (1993) Optimización del proceso de extracción del alginato de sodio a partir del alga café *Macrocystis pyfera*. Instituto Politecnico Nacional
- Bala, N., A. Dey, S. Das, R. Basu and P. Nandy. 2014. 'Effect of Hydroxyapatite nanorod on chickpea (*Cicer arietinum*) plant growth and its possible use as nano-fertilizer'. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 4 (3), 1061-1069
- Balasubramanian, M. (2014). COMPOSITE MATERIALS AND. CR Press.
- Bermúdez-García, V. S., Huaman Mujica, K., Castañeda-Vía, J. A., Landauro, C. V., Quispe, J., & Tay Chu Jon, L. Y. (2021). Obtención de hidroxiapatita a través de residuos biológicos para injertos óseos dentales. *Revista Estomatológica Herediana*, 31(2), 111-116. <https://doi.org/10.20453/reh.v31i2.3971>
- Brown, P. W., & Constantz, B. (1994). Hydroxyapatite and Related Materials. Physical Sciences. Published. <https://doi.org/10.1201/9780203751367>

- Campa-Molina, J., Ulloa-Godínez, G. S., Bucio-Galindo, L., Belío, I. A., Velázquez, R., & Rivera-Muñoz, E. M. (2007). Biomateriales: fundamentales, técnicas y aplicaciones. (Tesis). Universidad de Guadalajara, México.
- Cisneros-Ontiveros, H. G., Medellín-Castillo, N. A., Ilizarriturri-Hernández, C. A., Aldama-Aguilera, C., & Cárdenas-Tristán, A. (2020, octubre). Análisis de riesgo al ambiente y a la salud por la presencia de peces diablo (familia Loricariidae) en la Huasteca Potosina. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Ingeniería. Centro de Investigación y Estudios de Posgrado.
- Don, T. M., Chen, C. C., Lee, C. K., Cheng, W. Y., & Cheng, L. P. (2005). Preparation and antibacterial test of chitosan/PAA/PEGDA bi-layer composite membranes. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 16(12), 1503–1519.
- Flores-Hernández E. A., LiraSaldívar R. H., Ruiz-Torres N. A., García-López J. I., Moreno-Reséndez A., Rodríguez-Dimas N., Preciado-Rangel P., Mendoza-Retana S. S. (2021) Síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita y su efecto en plántulas de *Raphanus sativus*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 8(1): e2747. DOI: 10.19136/era.a8n1.2747
- Flores-Rojas, A. I., Díaz-Flores, P. E., Medellín-Castillo, N. A., Ovando-Medina, V. M., & Rodríguez-Ortiz, J. C. (2020). Biomaterials based on chitosan/orange peel as a controlled release matrix for KNO₃ : synthesis, characterization and their performance evaluation. *Iranian Polymer Journal*, 29(11), 1007-1017. <https://doi.org/10.1007/s13726-020-00858-w>
- Gashtasbi F, Hasannia S, Hasannia S, (2020) Comparative study of impact of animal source on physical, structural, and biological properties of bone xenograft. *Xenotransplantation*, e12628
- Haines, P. J. (1995). *Thermal Methods of Analysis. Principles, applications and problems*. Blackie Academic & Professional. London: Prentice Hall; 1995: 22-37

- Huan Y-C, Hsiao P-C, Chai H-J. (2011) Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblastlike cells. *Ceramics International*;(37): 1825–1831
- Jang K-J, Cho WJ, Seonwoo H, (2014) Development and Characterization of Horse Bone-derived Natural Calcium Phosphate Powders. *Journal of Biosystems Engineering*;39(2):122–33.
- Jia, C., Lu, P., & Zhang, M. (2020). Preparation and characterization of environmentally friendly controlled release fertilizers coated by leftovers-based polymer. *Processes*, 8(4), 2-15.
- Kaplan, D. L. (1998). Introduction to Biopolymers from Renewable Resources. In David L Kaplan (Ed.), *Biopolymers from Renewable Resources* (pp. 1–29). Springer Berlin Heidelberg.
- Khan, Avik, Khan, R. A., Salmieri, S., Le Tien, C., Riedl, B., Bouchard, J., Chauve, G., Tan, V., Kamal, M. R., & Lacroix, M. (2012). Mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced chitosan based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 90(4), 1601–1608.
- Kusrini, E., & Sontang, M. (2012). Characterization of x-ray diffraction and electron spin resonance: Effects of sintering time and temperature on bovine hydroxyapatite. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(2), 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2011.10.006>
- Leyva-Ramos, R., Medellín-Castillo, N. A., & Flores-Cano, J. V. (2015). Bone Char : Adsorbent Manufactured from Animal Bones Waste . Adsorption of Fluoride from Aqueous Solution Carbonizado de Hueso: Adsorbente Preparado a partir de Residuos de Huesos de Animales . Adsorción de Fluoruro en Solución Acuosa. *Bol. Grupo Español Carbón*
- Loja-Farez (2020) Obtención de polímero biodegradable a partir del alginato de calcio extraído de la biomasa del alga parda (*Sargassum Ecuadoreanum*). Tesis. Universidad Politécnica salesiana sede Cuenca

- Malla K, Regmi S, Nepal A, (2020) Extraction and Characterization of Novel Natural Hydroxyapatite Bioceramic by Thermal Decomposition of Waste Ostrich Bone. *International Journal of Biomaterials*; 1: 1-10.
- Medellín-Castillo, N. A., Cruz-Briano, S. A., Leyva-Ramos, R., Moreno-Piraján, J. C., Torres-Dosal, A., Giraldo-Gutiérrez, L., Labrada-Delgado, G. J., Pérez, R. O., Rodríguez-Estupiñan, J. P., Reyes Lopez, S. Y., & Berber Mendoza, M. S. (2020). Use of bone char prepared from an invasive species, pleco fish (*Pterygoplichthys* spp.), to remove fluoride and Cadmium(II) in water. *Journal of Environmental Management*, 256, 109956. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109956>
- Negm, N. A., Hefni, H. H. H., Abd-Elaal, A. A. A., Badr, E. A., & Abou Kana, M. T. H. (2020a). Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 681–702.
- Negm, N. A., Kana, M. T. H. A., Abubshait, S. A., & Betiha, M. A. (2020b). Effectuality of chitosan biopolymer and its derivatives during antioxidant applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1342–1369
- Piña-Barba, M. C., Murguía-Acevedo, N., Palma-Cortés, R., & Lima, E. (Éds.). (2006). Caracterización de hueso de bovino anórgánico Nukbone (Vol. 4, Número 20). <https://www.medigraphic.com/pdfs/ortope/or-2006/or064d.pdf>
- . Ramirez-Gutierrez CF, Londoño-Restrepo SM, Del Real A, Mondragón M, Rodríguez-García ME. (2017) Effect of the temperature and sintering time on the thermal, structural, morphological, and vibrational properties of hydroxyapatite derived from pig bone. *Ceramics International* 43,10: 7552-59.
- Rivera, J., Fetter, G., & Bosch, P. (2010). Efecto del pH en la síntesis de hidroxiapatita en presencia de microondas. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 15(4), 506-515. <https://doi.org/10.1590/s1517-70762010000400003>
- Rojas-Mayorga, C. K., Bonilla-Petriciolet, A., Silvestre-Albero, J., Aguayo-Villarreal, I. A., & Mendoza-Castillo, D. I. (2015). Physico-chemical characterization of

metal-doped bone chars and their adsorption behavior for water defluoridation. *Applied Surface Science*, 355, 748–760.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.07.163>

Shi P, Liu M, Fengjiao F, Cuiping Y, Lu W, Du M. (2018) Characterization of natural hydroxyapatite originated from fish bone and its biocompatibility with osteoblasts. *Materials Science and Engineering*; 90: 706-12.

Upadhyay, U., Sreedhar, I., Singh, S. A., Patel, C. M., & Anitha, K. L. (2021). Recent advances in heavy metal removal by chitosan based adsorbents. *Carbohydrate Polymers*, 251, 1-29. Vijayendra, S. V. N., & Shamala, T. R. (2014). Film forming microbial biopolymers for commercial applications-A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 34(4), 338–357.

Yates, M. R., & Barlow, C. Y. (2013). Life cycle assessments of biodegradable, commercial biopolymers - A critical review. *Resources, Conservation and Recycling*, 78, 54–66.

7. Cronograma sintético de actividades

	2022		2023		2024		2025	
	Ene-Jul	Ago-Dic	Ene-Jul	Ago-Dic	Ene-Jul	Ago-Dic	Ene-Jul	Ago-Dic
Cursos Optativos (2)								
Seminarios Multidisciplinarios (3)								
Desarrollo del protocolo o propuesta de tesis								
Revisión de la literatura								
Cumplimiento del objetivo: 1 al 3								
Examen predoctoral								
Cumplimiento del objetivo: 4 al 7								
Cumplimiento del objetivo: 8 al 12								
Primer artículo científico								
Segundo Artículo Científico								
Participación en al menos 2 congresos (nacional e internacional)								
Escritura de la tesis								
Presentación y defensa de la tesis								

Firma de aval:



Dr. Nahúm Andrés Medellín Castillo

Profesor investigador

Área Prevención y control del PMPCA