

# SÍNTESIS DE NANOPARTICULAS DE HIDROXIAPATITA Y SU TOXICIDAD EN LECHUGA (*Lactuca sativa* L.)

## HYDROXYAPATITE NANOPARTICLES SYNTHESIS AND THEIR TOXICITY ON LETTUCE (*Lactuca sativa* L.)

Ortiz, C.G.<sup>1</sup>, Carrillo-González, R.<sup>1\*</sup>; González-Chávez, M.C.A.<sup>1</sup>, López, L.J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Edafología. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, México. CP 56230. <sup>2</sup>Instituto de Estudios Ambientales, Universidad de la Sierra Juárez, Ixtlán de Juárez 68725, Oaxaca, México.

\*Autor de correspondencia: crogelio@colpos.mx

### RESUMEN

Se sintetizó hidroxiapatita tamaño nanométrico mediante extracción biológica a partir de huesos de pescado y por precipitación química. Los materiales sintetizados se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido, potencial zeta, conductividad eléctrica, tamaño hidrodinámico, por difracción de rayos X y pruebas de solubilidad. Se evaluó la toxicidad de las nanopartículas en lechuga (*Lactuca sativa* L.). El menor y más homogéneo tamaño de partícula (89 a 99 nm) de  $\beta$ -hidroxiapatita (nHAP) se obtuvo con el método de precipitación química, con formas esféricas y estables. Por el procedimiento biológico se obtuvieron partículas irregulares en forma y tamaño. Las nHAP en polvo tuvieron solubilidad muy baja y se observó pérdida del material de menor tamaño en el proceso de secado. Las nHAP en solución no tuvieron efectos tóxicos en la germinación de semillas de lechuga.

**Palabras clave:** precipitación química, secado por aspersión, potencial zeta, difracción de rayos X.

### ABSTRACT

Hydroxyapatite of nanometric size was synthesized through biological extraction from fish bones and by chemical precipitation. The materials synthesized were characterized through scanning electron microscopy, zeta potential, electric conductivity, hydrodynamic size, X-ray diffraction, and solubility tests. The toxicity of the nanoparticles was evaluated in lettuce (*Lactuca sativa* L.). The smallest and most homogenous particle size (89 to 99 nm) of  $\beta$ -hydroxyapatite (nHAP) was obtained with the chemical precipitation method, with spherical and stable shapes. Through the biological procedure, irregular particles in shape and size were obtained. The nHAP in powder had very low solubility and a loss of the material of smaller size was observed in the drying process. The nHAP in solution did not have toxic effects in the germination of lettuce seeds.

**Keywords:** chemical precipitation, drying by spraying, zeta potential, X-ray diffraction.

**Agroproductividad:** Vol. 10, Núm. 12, diciembre, 2017, pp: 98-105.

**Recibido:** junio, 2017. **Aceptado:** septiembre, 2017.

## INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es el estudio y manipulación de la materia en la nanoescala de 1 hasta 100 nm (Ramsden, 2011). Este tamaño permite una amplia posibilidad de aplicaciones (Guo *et al.*, 2014). Las estructuras a tamaño nanométrico tienen propiedades y aplicaciones no observables en la materia a escala mayor (Corbett *et al.*, 2002). El tamaño de estos materiales permite que manifiesten propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a las del mismo material con tamaños de partícula mayores. Záyago *et al.* (2013) explicaron la diferencia en las propiedades de los materiales debido principalmente a dos razones: las nanopartículas poseen mayor superficie por unidad de volumen y por tanto mayor reactividad. El efecto cuántico hace que la materia a menor tamaño experimente mayores cambios en las propiedades magnéticas, ópticas, eléctricas, mecánicas y térmicas. El método de síntesis de nanopartículas resulta en variaciones en las propiedades físicas y químicas de los materiales. Hay cinco tipos de síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita (NPH): a saber: a) métodos secos, b) métodos húmedos, c) procesos en alta temperatura, d) extracción biológica, e) métodos combinados; cada uno con diversas subdivisiones (Sadat-Shojai *et al.*, 2013). Uno de los efectos secundarios de la utilización de los nanomateriales es su liberación al ambiente (Bystrzejewska-Piotrowska *et al.*, 2009), lo que puede ser una preocupación por sus implicaciones ambientales (Forloni, 2012). La toxicidad y degradación de estos nanomateriales no puede evaluarse con precisión, ni de forma generalizada (Frejo *et al.*, 2011). Sus efectos en el ambiente dependen del tipo de nanopartícula, propiedades físicas y químicas y además del medio en el que se liberan (Remédios *et al.*, 2012), lo que dificulta su rastreo. Casi toda la roca fosfórica producida actualmente (95%) se usa para producir fertilizantes (Aydin *et al.*, 2010); sin embargo se puede destinar a otros usos en los cuales es deseable mayor reactividad, como para atrapar compuestos tóxicos. Desde este punto de vista las nanopartículas pueden ser una opción útil por su reactividad (Chen *et al.*, 2010). Para el uso de nanomateriales en la actividad agrícola o en química ambiental es necesario seleccionar procedimientos de bajo costo, evaluar su eficiencia en comparación con los materiales a escala micrométrica y a granel, así como su toxicidad en el ambiente donde puedan ser liberados. Considerando esta información, este estudio tuvo como objetivos: 1) Sintetizar nanopartículas de hidroxiapatita por los métodos convencional de precipitación química y extracción biológica por hidrólisis alcalina y; 2) analizar el riesgo de

toxicidad aguda de estos nanomateriales en semillas y plántulas de lechuga.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Síntesis:** La finalidad de comparar los procedimientos de síntesis es recomendar el método con el que se obtenga el menor y más homogéneo tamaño de partícula. Para la síntesis biológica, el tejido óseo de salmón se calentó a 200 °C durante 3 h para remover tejido blando. Se enjuagó con agua y se repitió la operación a 100 °C por 4 h para eliminar el tejido remanente. Los huesos se hirvieron por una hora con 500 mL de acetona (0.02%) y NaOH (2%). La fracción sólida se enjuagó varias veces para eliminar las grasas y se secó en horno a 100 °C por 3 h. Se pesó 10 g del sedimento resultante y se agregó 100 mL de NaOH 2M a 100 °C. Este paso se repitió varias veces para remover las trazas de carne, grasa y colágeno. Se lavó con agua, se centrifugó a 1000 rpm durante cinco min hasta alcanzar pH de 7. El sedimento se secó a 100 °C por una h (Venkatesan *et al.*, 2015). La síntesis química se hizo a partir de las siguientes soluciones: Ca(OH)<sub>2</sub> 0.1 M y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.06 M. La ecuación de la reacción de síntesis es la siguiente:



La solución de hidróxido se calentó (80 °C) antes de la adición del ácido con agitación constante a 400 rpm y en sistema abierto (Kumar *et al.*, 2004), como energía de activación. La solución ácida (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) se adicionó con una bomba peristáltica gota a gota sobre el hidróxido a una velocidad de 3 mL min<sup>-1</sup>. El pH de reacción se mantuvo en 10 con solución de KOH 1 M. Al terminar la reacción, la hidroxiapatita se dejó cristalizar por 1 h con la misma agitación y temperatura (Gentile *et al.*, 2015). La solución se enfrió agitando por 1.5 h, y se colocó en un baño de ultrasonido (a 40 W) por 30 min para disgregar los conglomerados y reducir el tamaño de las partículas.

**Caracterización de nanopartículas:** Se midió el tamaño de partículas en solución (diámetro hidrodinámico), el potencial zeta (mediante electroforesis Doppler) con el Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments), mediante la técnica dispersión de luz dinámica (DLS) a temperatura ambiente. De manera simultánea se determinó el índice de polidispersidad (PDI). Los valores cercanos a 0 indican que la muestra es monodispersa; mientras valores cercanos a la unidad indican que la muestra presenta gran variedad de tamaños. El tamaño y forma de partículas secas se midió con microscopio electrónico

de barrido (JEOL Japan Scanning Electron Microscopy 6390 SEM). La eficiencia de la síntesis se determinó con la concentración de fósforo y calcio remanente en el sobrenadante, después de centrifugar las muestras por 10 min a 10,000 rpm. El calcio se determinó por absorción atómica y el fósforo total por colorimetría usando el reactivo Armstrong, formando un complejo color azul (Murphy, 1962). Se utilizó un equipo de difracción (Rigaku modelo Miniflex 600), con un tubo de rayos X, radiación de  $\text{Cu K}\alpha$  ( $\lambda=1.54 \text{ \AA}$ ), foco lineal, 40 kV y 15 mA. En el haz incidente se colocó una rendija Soller con filtro de Ni y rendija de 0.5 mm. En la óptica difractada se utilizó un detector Dtex ultra de alta velocidad para obtener los patrones de difracción de alta calidad. Se realizaron mediciones en geometría simétrica o de polvos ( $2\theta$ ) de 2 a 100 grados con tamaño de paso de 0.01 a 3 grados  $\text{min}^{-1}$ . Se midió la concentración total de fósforo en las nanopartículas en polvo, para lo cual se digirió la muestra con 4 mL de la mezcla  $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HClO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$  relación 4:1:2 (Batey *et al.*, 1974). La concentración de fósforo en las nanopartículas sintetizadas vía precipitación química (nHAP) se comparó con la de: 1) Fosfato dicálcico anhidro (DCPA) grado analítico ( $\text{CaHPO}_4$ ); 2) roca fosfórica de Baja California Sur (RFBCS); 3) roca fosfórica de San Luis Potosí (RFSLP); 4) roca fosfórica de Marruecos (RFM); 5) roca fosfórica de Zimapán, Hidalgo (RFZ). La solubilidad de nHAP se midió extrayendo (0.3 g) con 30 mL de ácido cítrico a 2% (Brathwaite *et al.*, 1989); también se comparó con los cinco materiales mencionados anteriormente.

**Prueba de fitotoxicidad:** Se determinó fitotoxicidad (imbibición y germinación de lechuga) de las nanopartículas obtenidas por síntesis química (nHAP; Bowers *et al.*, 1997). Se utilizaron semillas peletizadas de lechuga italiana var. Starfighter (95% de germinación garantizada en la etiqueta). La prueba de efecto sobre la imbibición se hizo sumergiendo durante 1 h 100 semillas seleccionadas en 40 mL de las siguientes soluciones (USEPA, 1996): 1) Agua destilada como testigo; 2) RFM (8,000  $\text{mg L}^{-1}$ ); 3) nHAP (8,000  $\text{mg L}^{-1}$ ); 4) fosfato dicálcico anhidro (DCPA), (8,000  $\text{mg L}^{-1}$ ). Después del tratamiento se evaluó la humedad y el contenido de fósforo. El efecto en la germinación se evaluó exponiendo las semillas a las soluciones mencionadas en cajas Petri cubiertas con papel filtro, hasta su germinación. Las unidades experimentales se dejaron en la obscuridad a temperatura constante (20 °C) y cada 24 h se revisó la proporción de germinación (emergencia de la radícula; Joseph *et al.*, 2014).

Porcentaje de germinación total o potencial germinativo (PGT):

$$PGT = \frac{\text{Semillas germinadas}}{\text{Semillas totales}} * 100$$

Índice de germinación (IG): Se calculó mediante la siguiente fórmula:

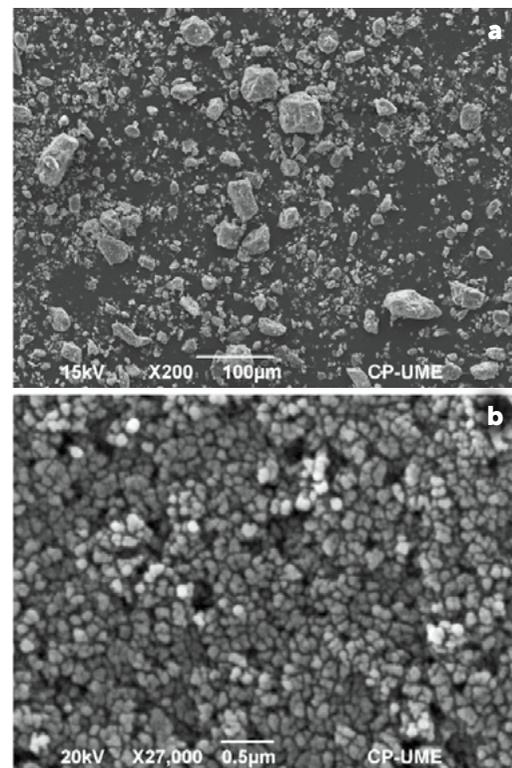
$$IG = \frac{PGR * CRR}{100}$$

Donde: PRG es el porcentaje de semillas germinadas en el tratamiento con respecto al testigo; CRR es el crecimiento relativo de la radícula

$$PRG = \frac{\text{Semillas germinadas en el tratamiento}}{\text{Semillas germinadas en el testigo}} * 100$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Caracterización de nanopartículas:** Tamaño. Las partículas de hidroxiapatita (FHAP) obtenidas por extracción biológica tuvieron tamaños superiores a los 100 nm, con amplia variabilidad en tamaño y formas irregulares (Figura 1a). Las partículas de hidroxiapatita obtenidas por este



**Figura 1.** Forma y tamaño de partículas de hidroxiapatita obtenidas por: a) síntesis biológica (FHAP), b) síntesis química (nHAP).

método de síntesis no se utilizaron en las pruebas posteriores. El intervalo amplio de tamaño de partícula obtenido en la síntesis biológica puede atribuirse a la hidrólisis final con NaOH 2 M. En este estudio se utilizó una relación de 1:10 partículas de hidroxiapatita: solución alcalina, pero Venkatesan *et al.* (2011) utilizaron una relación 1:30, mayor relación de partículas:solución alcalina que permite hidrólisis mucho más fuerte. Con el método de precipitación química se obtuvieron nHAP con distribución homogénea de tamaños de partícula, pero inferior a 100 nm (Cuadro 1), pese a que las variaciones en la temperatura fueron de 4 °C. La temperatura es el factor más importante para controlar el tamaño de las partículas, debido a que variaciones pequeñas de temperatura afectan el radio hidrodinámico o la aglomeración de las moléculas. El pH es el segundo factor más importante, pues la síntesis debe hacerse en condiciones alcalinas; ya que de este factor depende la estabilidad de las estructuras que se forman. Otro factor que provoca variaciones es la concentración de los reactivos; pues en soluciones muy concentradas el tamaño de las partículas aumenta. La homogeneidad en la distribución de los tamaños de partícula (muestra monodispersa) se observa durante todo el proceso de estandarización del método. Esto se corrobora con los valores de PDI (Cuadro 1) muy por debajo del valor máximo 1 (Lancheros *et al.*, 2014).

Los intervalos de tamaños de nHAP se deben a las variaciones en el tiempo de nucleación de las partículas con respecto a su tiempo de crecimiento. A mayor tiempo de nucleación y menor tiempo de crecimiento, se obtienen nanopartículas con menor tamaño (González *et al.*, 2015). Se asume al obtener partículas menores a 100 nm el tiempo de nucleación de las mismas fue mayor que el tiempo de crecimiento. Forma. Las nHAP sintetizadas fueron esféricas, lo cual concuerda con lo reportado por Kumar *et al.* (2004) para este método de síntesis (Figura 2). Según este autor, el tamaño y forma de las partículas es dependiente tanto de la concentración y tipo de los reactivos, como de la temperatura. Conforme la tem-

peratura de síntesis aumenta, se cambia de nanoagujas (25 nm de ancho y más de 200 nm de largo) a nanopartículas esféricas. Sin embargo, estos cambios se dan en orden inverso si se usan otros reactivos, como los mostrados en la siguiente ecuación:



La homogeneidad o monodispersión de tamaños de partícula depende de que ocurra nucleación homogénea, la cual se describe a partir del modelo de LaMer y Dinegar (1950). Para tener nucleación homogénea se requiere que la solución se encuentre sobresaturada. Esto implica condiciones de inestabilidad termodinámica en ausencia de una interface sólida, lo cual podría explicar la dificultad para controlar las variaciones internas de temperatura en la solución. Según González *et al.*, (2015) los procesos termodinámicos y la cinética a escala nanométrica resultan más complicados que en procesos a escala micrométrica; debido a los altos valores de relación superficie/volumen. A pesar de estas complicaciones, se logró nucleación homogénea durante la síntesis con 99.5% de las nanopartículas del mismo tamaño. *Potencial Zeta*. De acuerdo con Velasco-Rodríguez *et al.* (2012) una suspensión se considera inestable si la variación del potencial Zeta es mayor a  $\pm 30$  mV, en este caso la variación observada fue mucho menor a ese valor (Cuadro 1). El potencial Zeta adquiere valores negativos posiblemente debido a la presencia de grupos fosfato e hidroxilo (Maia *et al.*, 2016).

**Eficiencia de síntesis:** Se observó que 99.7% del fósforo usado en la reacción formó hidroxiapatita, quedando sólo de 0.26% a 0.1% en solución. No se detectó relación lineal entre el gasto de KOH y la cantidad de cationes o aniones en solución. Pero como el sistema de reacción fue abierto, es posible que durante la síntesis el CO<sub>2</sub> atmosférico pueda sustituir al fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) en diversas proporciones en la estructura de la hidroxiapatita, ocurriendo sustituciones tipo B que son predominantes

Cuadro 1. Variación de las propiedades físico-químicas de la hidroxiapatita en solución durante el proceso de estandarización.

Muestra	Tamaño hidrodinámico (nm)	<sup>a</sup> PDI	Potencial Zeta (mV)	<sup>b</sup> CE (mS cm <sup>-1</sup> )	Eficiencia de síntesis (%)	Gasto KOH (mL)
Mínimo	85 ± 3.50	0.15 ± 0.01	-49.97 ± 1.60	1.88 ± 0.02	96.25	18
Estándar	99.6 ± 0.29	0.16 ± 0.02	-48.53 ± 1.27	2.34 ± 0.02	95.00	8
Máximo	8092 ± 10191	0.21 ± 0.07	-0.008 ± 0.001	4.34 ± 0.01	91.25	35

<sup>a</sup>PDI=Polidispersidad, <sup>b</sup>CE=conductividad eléctrica. Media±desviación estándar, n=3.

en hidroxiapatita sintetizada por precipitación química (Barralet *et al.*, 2002). La conductividad eléctrica de la solución de  $H_3PO_4$  0.06 M usada fue de  $10.54 \text{ mS cm}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Este valor se redujo notablemente después de la reacción y formación de nHAP. Esto se explica por la baja solubilidad de las nHAP. Prakash *et al.*, (2006) reportaron conductividad de  $7.31 \text{ mS cm}^{-1}$  a  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  y pH de 1.84. La disociación de  $H_3PO_4$  en iones ( $H^+/H_2PO_4^-$  a  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ) es de 24%, la cual se incrementa en forma directamente proporcional con el pH, durante la síntesis ( $80 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). El pH se ajustó a 10. Bajo estas condiciones el porcentaje de disociación del fosfato varía pues las constantes de equilibrio cambian en función de la temperatura, (van't Hoff, 1884).

**Pureza por método de síntesis:** El análisis elemental dio una relación molar Ca/P de 1.59 (Figura 2), muy cercana al valor teórico de hidroxiapatita con fórmula general  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  (Ca/P=1.667). La diferencia de valor puede explicarse por la presencia de minerales secundarios como fosfato tricálcico (Best *et al.*, 2008). La concentración de carbono podría indicar sustitución de carbonatos por el ión fosfato en la estructura de la hidroxiapatita (hidroxiapatita tipo B). Durante el secado por aspersión de las nHAP en suspensión, se perdió 50% del material. El peso de las nHAP secas fue de 2 g. Los espectros de difracción de rayos X muestran que se produjo nHAP con parámetros cristalográficos semejantes. El espectro del mineral de referencia que más se asemeja a estas partículas corresponde a una apatita con sustituciones de sílice, con fórmula química secundaria  $Ca_{10}(PO_4)_{4.92}(SiO_4)_{1.08}(OH)_{0.664}$  (Figura 3).

Se observa el pico principal de la hidroxiapatita, con la mayor intensidad a  $2\theta=31.773$  correspondiente al plano 1 2 1 acompañado por dos picos con menor intensidad a  $2\theta=32.093$  y  $2\theta=32.943$ ; correspondientes a los planos 1 1 2 y 0 3 0 respectivamente. La amplitud de los picos de difracción muestra tamaño de cristal muy grande, esto posiblemente se debe al secado.

Los parámetros de celda fueron muy parecidos a los de la hidroxiapatita estequiométrica (JCPDS card, 9-432), lo que implica que sus estructuras

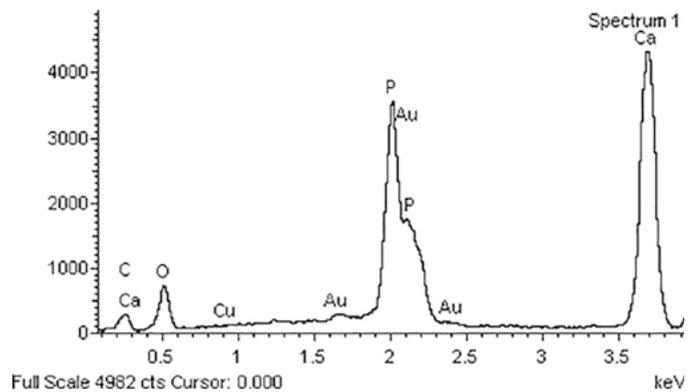


Figura 2. Análisis elemental de partículas mediante microanálisis EDAX.

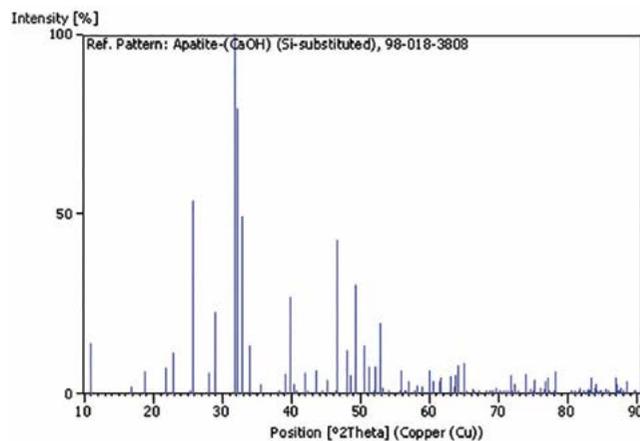
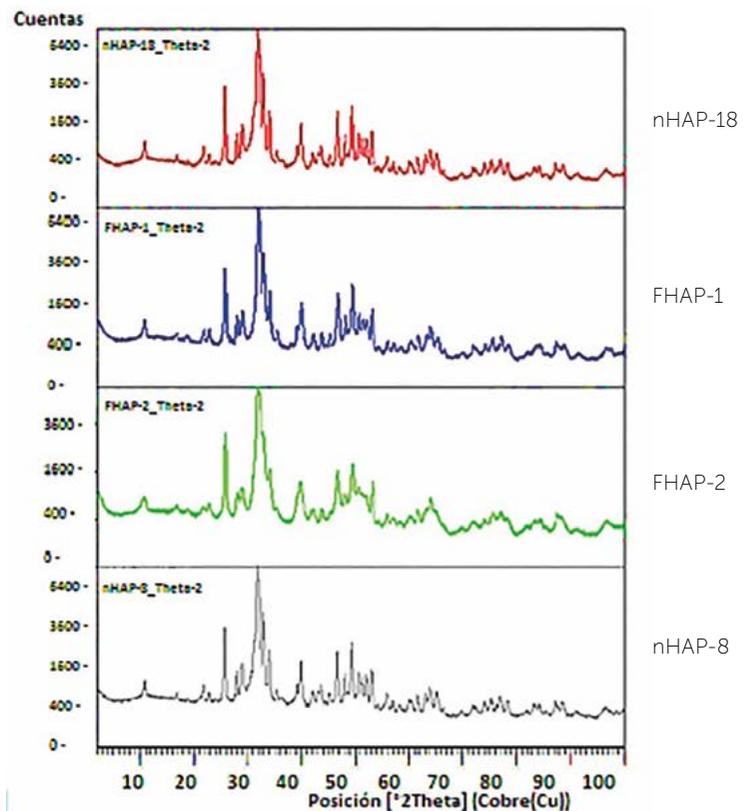
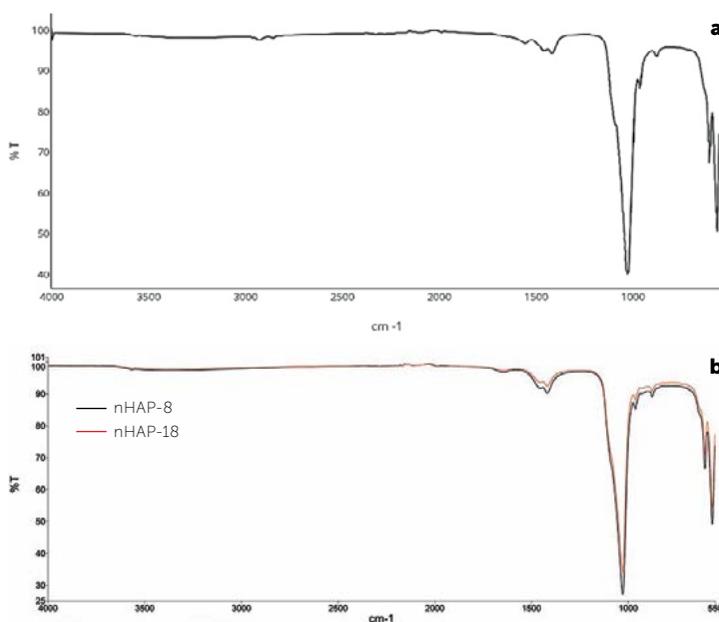


Figura 3. Espectros de difracción de rayos X de las muestras sólidas de partículas sintetizadas mediante los métodos químico (nHAP) y biológico (FHAP) y patrón de referencia de apatita con sustituciones de sílice.

son semejantes. En la síntesis biológica, las diferencias en los parámetros se explican debido a las sustituciones iónicas que presenta la hidroxiapatita en los huesos de cualquier animal. Como lo reportaron Tamamura *et al.*, (2016) para hidroxiapatita obtenida de huesos de bovino. En el caso de la síntesis química, las diferencias pueden deberse a iones potasio agregado para controlar el pH, que sustituyen al calcio dentro de la estructura de la hidroxiapatita. Esto es importante para definir el uso al que se destinen las nanopartículas. Las nHAP obtenidas por el método biológico se pueden usar en aplicaciones donde el tamaño no es el factor principal en la reactividad del material como reservorios de agentes anticorrosivos (Ferreira & Montemor, 2010). La síntesis biológica mediante hidrólisis alcalina resulta más amigable con el ambiente (Venkatesan *et al.*, 2011), pues se puede sintetizar a partir de residuos biológicos.

**Espectroscopia infrarroja (FTIR):** En los espectros de las nHAP sintetizadas por método químico (Figura 4b) se observan las bandas de absorción ubicadas a 564, 602 y 1027  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a las vibraciones asimétricas tipo flexión y estiramiento y asimétricas de estiramiento (Nikcevic *et al.*, 2006), la banda en 962  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a vibraciones de estiramiento del  $\text{PO}_4^{3-}$ , respectivamente. Las bandas en 876 y 1419  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a la sustitución (tipo B) de  $\text{CO}_3^{2-}$  por  $\text{PO}_4^{3-}$ ; asociadas a vibraciones de flexión fuera del plano y vibraciones de estiramiento asimétrico. Esto concuerda con lo reportado por Gunduz (2014) para nHAP. Las sus-



**Figura 4.** Espectro de infrarrojo (FTIR) de partículas de hidroxiapatita (a) síntesis biológica y (b) síntesis química.

**Cuadro 2.** Parámetros cristalográficos de partículas de hidroxiapatita

Parámetro	Valor	<sup>a</sup> JCPDS	
Sistema cristalino	Hexagonal	Hexagonal	
Grupo espacial	P 63/m		
Número de grupo espacial	176		
Ejes	a (Å):	9.411	9.418
	b (Å):	9.411	9.411
	c (Å):	6.917	6.884
Ángulos	Alfa (°):	90.000	
	Beta (°):	90.000	
	Gamma (°):	120.000	
Densidad calculada ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ):	3.12		

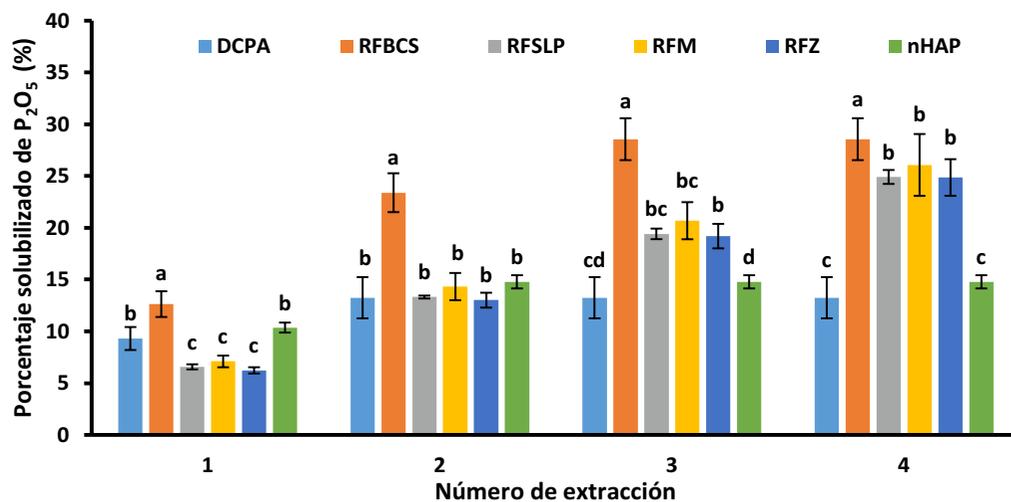
<sup>a</sup> Hidroxiapatita estequiométrica (JCPDS card, 9-432; Nikcevic *et al.*, 2006).

tituciones de  $\text{CO}_3^{2-}$  causan variaciones en la eficiencia de síntesis, reflejada ésta como variación en la intensidad de la vibración de enlaces  $\text{PO}_4^{3-}$  (picos 1027, 602 y 564  $\text{cm}^{-1}$ ).

La concentración de fósforo (126.61  $\text{g kg}^{-1}$ ) en la roca fosfórica de Marruecos (RFM) es similar al de las nHAP (118.68  $\text{g kg}^{-1}$ ), razón por la cual se usó esta roca fosfórica como material de referencia para las pruebas de toxicidad. Las rocas fosfóricas de San Luis (RFSLP; 137.6  $\text{g kg}^{-1}$ ) y Zimapan (RFZ; 136.78  $\text{g kg}^{-1}$ ) tuvieron mayor concentración de fósforo, en contraste con la de Baja California Sur (RFBCS; 76.93  $\text{g kg}^{-1}$ ), lo cual se debe al origen de los minerales que determina la cantidad de impurezas.

**Pruebas de solubilidad:** El fosfato dicálcico anhidro (DCPA) y nHAP solubilizaron únicamente fósforo durante dos extracciones, con igual porcentaje acumulado pero menor que los otros minerales. La roca fosfórica a granel liberó más lentamente el P: RFBCS en tres extracciones y, RFSLP, RFM y RFZ durante las cuatro extracciones. Las variaciones en la solubilidad pueden ser explicadas por las impurezas como calcita, dolomita o yeso (Axelrod & Greidenger, 1979). Esto concuerda con lo presentado por Hedley *et al.*, (1988). Las impurezas influyen en la reacción con los extractantes. (Gholizadeh *et al.*, 2009)

Para obtener nHAP en polvo en tamaño nano se necesita del secado por aspersión y éste presenta varios inconvenientes: mayor gasto energético; pérdida de las partículas por volatilización. Se



**Figura 5.** Solubilidad acumulada de fósforo ( $P_2O_5$ ) de los minerales utilizados. Letras distintas indican diferencias significativas entre los minerales ( $p < 0.05$ ).  $n=3$ . DCPA=Fosfato dicálcico anhidro, RFBCS=Roca fosfórica de Baja California Sur, RFSLP=Roca fosfórica de San Luis Potosí, RFM=Roca fosfórica de Marruecos, RFZ=Roca fosfórica de Zimapán Hidalgo, nHAP=nanopartículas de hidroxiapatita.

recomienda usar las nanopartículas directamente en solución, ya que presentan menor tamaño y mayor reactividad.

### Ensayo de toxicidad de nanopartículas de hidroxiapatita

La concentración de nHAP ( $8000 \text{ mg L}^{-1}$ ) usadas en esta prueba equivale a  $247 \text{ mg L}^{-1}$  de P extraíble con ácido cítrico; concentración que podría ser tóxica. Sin embargo, durante la prueba de imbibición de las semillas, las nHAP en suspensión no fueron absorbidas por las semillas. La suspensión de hidroxiapatita presentó mayor fuerza iónica que el testigo. De acuerdo con Chaparro *et al.* (2011) existe relación inversa entre la fuerza iónica y la absorción del agua; sin embargo, no se observó este efecto en las propiedades de la semilla. Las semillas germinaron al día siguiente de embebidas. El promedio del porcentaje de germinación de semillas de lechuga fue 100% en agua destilada (testigo) y no hubo diferencias con la aplicación de nHAP, DCAP y RFM. Esto significa que las nHAP no tienen efectos tóxicos en el proceso germinativo. La concentración de fósforo disponible en los minerales no es suficiente para ser absorbida por las semillas. Por último, la reducción en el tamaño de partículas en el caso de nHAP no facilitó su penetración o absorción. Como las cantidades aplicadas son pequeñas, el pH (8) de la solución no parece tener efecto tóxico en las plantas.

### CONCLUSIONES

**El método** de síntesis de hidroxiapatita nanométrica más eficiente fue la precipitación química; ya que se obtuvieron tamaños menores a 100 nm. La morfología de

las nHAP fue esférica, con distribución de tamaños homogénea. El secado por aspersion causó pérdidas por lo que debe mejorarse la forma de secado. Las nHAP en solución no son tóxicas para semillas de lechuga.

### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada al primer autor. A la extinta Línea Prioritaria de Investigación (LPI 16) Innovación Tecnológica del CP por su apoyo en la Unidad de Microscopía Electrónica, y las facilidades para el uso del Zeta Sizer Nano.

### LITERATURA CITADA

- Axelrod S., Greidinger D. 1979. Phosphate solubility tests - interference of some accessory minerals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30(2), 153-157. Recuperado a partir de <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2740300209>
- Aydin I., Aydin F., Saydut A., Bakirdere E.G., Hamamci C. 2010. Hazardous metal geochemistry of sedimentary phosphate rock used for fertilizer (Mazidag, SE Anatolia, Turkey). *Microchemical Journal*, 96(2), 247-251. <http://doi.org/10.1016/j.microc.2010.03.006>
- Barralet J., Knowles J.C., Best S., Bonfield W. 2002. Thermal decomposition of synthesised carbonate hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13(6), 529-533. <http://doi.org/10.1023/A:1015175108668>
- Batey T., Cresser M.S., Willett I.R. 1974. Sulphuric-perchloric acid digestion of plant material for nitrogen determination. *Analytica Chimica Acta*, 69(2), 484-487. [http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)80919-3](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)80919-3)
- Best S.M., Porter A.E., Thian E.S., Huang J. 2008. Bioceramics: Past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society*, 28(7), 1319-1327. <http://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2007.12.001>
- Bowers N., Pratt J.R., Beeson D., Lewis M. 1997. Comparative Evaluation of Soil Toxicity Using Lettuce Seeds and Soil Ciliates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(2), 207-213. <http://doi.org/10.1002/etc.5620160216>
- Braithwaite A.C., Eaton A.C., Groom P.S. 1989. Some factors associated with the use of the extractants 2 % citric acid and 2 % formic acid as estimators of available phosphorus in fertiliser products, 175-181.

- Bystrzejewska-Piotrowska G., Golimowski J., Urban P.L. 2009. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Management*, 29(9), 2587-2595. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.04.001>
- Chaparro A.S.P., Gil G.J.H., Aristizábal T.I. D. 2011. Efecto de la hidratación y la cocción en las propiedades físicas y funcionales de la harina de vitabosa (*Mucuna deeringiana*). *Vitae*, 18(2), 133-143.
- Chen S.B., Ma Y.B., Chen L., Xian K. 2010. Adsorption of aqueous Cd 2+, Pb 2+, Cu 2+ ions by nano-hydroxyapatite: Single- and multi-metal competitive adsorption study. *Geochemical Journal*, 44, 233-239. <http://doi.org/10.2343/geochemj.1.0065>
- Corbett J., McKeown P.A., Peggs G.N., Whatmore R. 2002. Nanotechnology: International Developments and Emerging Products, 47(8), 1324-1328. [http://doi.org/10.1016/S0007-8506\(07\)63454-4](http://doi.org/10.1016/S0007-8506(07)63454-4)
- Ferreira M.G.S., Montemor M.F. 2010. Hydroxyapatite Microparticles as Feedback-Active Reservoirs of Corrosion, 21(11), 3011-3022. <http://doi.org/10.1021/am1005942>
- Forloni G. 2012. Responsible nanotechnology development. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(8). <http://doi.org/10.1007/s11051-012-1007-1>
- Frejo M., Díaz M., Lobo M., García J., Capó M. 2011. Nanotoxicología ambiental : retos actuales, 26(2).
- Gentile P., Wilcock C., Miller C., Moorehead R., Hatton P. 2015. Process Optimisation to Control the Physico-Chemical Characteristics of Biomimetic Nanoscale Hydroxyapatites Prepared Using Wet Chemical Precipitation. *Materials*, 8(5), 2297-2310. <http://doi.org/10.3390/ma8052297>
- Gholizadeh A., Ardalan M., Tehrani M.M., Hosseini H. M., Karimian N. 2009. Solubility test in some phosphate rocks and their potential for direct application in soil. *World Applied Sciences Journal*, 6(2), 182-190.
- González J. E. E. 2015. Nanomateriales: Nanopartículas coloidales. Colombia. Nanocitec. ISBN: 978-950-46-6931-5
- Gunduz O. 2014. A simple method of producing hydroxyapatite and tri calcium phosphate from coral (*Pocillopora verrucosa*). *Journal of the Australian Ceramic Society*, 50(2), 52-58.
- Guo D., Xie G., Luo J. 2014. Mechanical properties of nanoparticñes: basic and applications. *J. Phys. D. Appl. Phy* 47(1), 1-25.
- Hannah W., Thompson P.B. 2008. Nanotechnology, risk and the environment: a review. *Journal of Environmental Monitoring*, 10(3), 291. <http://doi.org/10.1039/b718127m>
- Hashim M.A., Mukhopadhyay S., Sahu J.N., Sengupta B. 2011. Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. *Journal of Environmental Management*, 92(10), 2355-2388. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.009>
- Hedley M.J., Bolan N.S., Braithwaite A.C. 1988. Single superphosphate-reactive phosphate rock mixtures. 2. The effect of phosphate rock type and denning time on the amounts of acidulated and extractable phosphate. *Fertilizer Research*, 16(2), 179-194. <http://doi.org/10.1007/BF01049773>
- Joseph A., Romero R., Alberto C., Salazar R., Arturo R., Picos R., Díaz S. 2014. Índices De Germinación Y Elongación Radical De, 30(2), 307-316.
- Kumar R., Prakash K.H., Cheang P., Khor K.A. 2004. Temperature driven morphological changes of chemically precipitated hydroxyapatite nanoparticles. *Langmuir*, 20(13), 5196-5200. <http://doi.org/10.1021/la049304f>
- Lancheros C.A. Guerrero R.D. Godoy-Silva 2014. Producción de nanopartículas de PLCA por el método de evaporación para encapsular N-acetilcisteína (NAC). *Univ. Sci.* 19: 161-168.
- LaMer V.K., Dinegar R.H. 1950. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 72, No. 11, 1950, pp. 4847-4854. [doi:10.1021/ja01167a001](http://doi.org/10.1021/ja01167a001)
- Lindsay W.L. 1980. Chemical Equilibria in Soils. *Clays and Clay Minerals*, 28(4), 319-319. <http://doi.org/10.1346/CCMN.1980.0280411>
- Liu R., Lal R. 2014. Synthetic apatite nanoparticles as a phosphorus fertilizer for soybean (*Glycine max*). *Scientific Reports*, 4, 5686. <http://doi.org/10.1038/srep05686>
- Murphy J.P.R. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters., 27, 31-36.
- Nikcevic I., Maravic D., Ignjatovic N., Mitric M., Makovec D., Uskokovic D. 2006. The formation and characterization of nanocrystalline phases by mechanical milling of biphasic calcium phosphate/poly-L-lactic biocomposite. *Materials Transactions* 47: 2980-2986.
- Ostwald W. 1917. An introduction to theoretical and applied colloid chemistry.
- Prakash K.H., Kumar R., Ooi C.P., Cheang P., Khor K. A. 2006. Conductometric study of precursor compound formation during wet-chemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(48), 24457-24462. <http://doi.org/10.1021/jp065200x>
- Ramsden J.J. 2011. Chapter 12 - The Impact of Nanotechnology. *Nanotechnology*, 227-246. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-096447-8.00012-0>
- Remédios C., Rosário F., Bastos V. 2012. Environmental Nanoparticles Interactions with Plants: Morphological, Physiological, and Genotoxic Aspects. *Journal of Botany*, 2012, 1-8. <http://doi.org/10.1155/2012/751686>
- Sadat-Shojai M., Khorasani M.T., Dinpanah-Khoshdargi E., Jamshidi A. 2013. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>
- Tamamura R., Kono T., Okada H., Kuwada-kusunose T., Suzuki K., Gotouda H., Sakae T. 2016. Crystallographic Study of the Immature Bovine Incisor Enamel and Dentin. *Journal of Hard Tissue Biology*, 25(4), 421-426.
- Taniguchi N. 1975. On the basic concept of 'nanotechnology'. In: Proceedings of international conference on production engineering Tokyo Part II. Japan Society of Precision Engineering, (Japan Society of Precision Engineering).
- USEPA. 1996. Ecological effects test guidelines. Seed germination/root elongation toxicity tes. U.S. Environmental Protection Agency, 712-Na-96-1.
- Velasco-Rodríguez V., Cornejo-Mazon M., Flores-Flores J.O., Gutierrez-Lopez G.F., Hernandez-Sanchez H. 2012. Preparation and properties of alpha-lipoic acid-loaded chitosan nanoparticles. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 11(1), 155-161.
- Venkatesan J., Lowe B., Manivasagan P., Kang K.H., Chalisserry E. P., Anil S., Kim S.K. 2015. Isolation and characterization of nano-hydroxyapatite from salmon fish bone. *Materials*, 8(8), 5426-5439. <http://doi.org/10.3390/ma8085253>
- Venkatesan J., Qian Z. J., Ryu B., Thomas N.V., Kim S.K. 2011. A comparative study of thermal calcination and an alkaline hydrolysis method in the isolation of hydroxyapatite from Thunnus obesus bone. *Biomedical materials (Bristol, England)*, 6(3), 35003. <http://doi.org/10.1088/1748-6041/6/3/035003>
- Záyago E., Foladori G., Appelbaum R., Arteaga E. 2013. Empresas nanotecnológicas en México: hacia un primer inventario. *Estudios Sociales*, 42, 9-25.