

ARTÍCULO ORIGINAL / Original

SÍNTESIS DE CERÁMICAS TIPO HIDROXIAPATITA OBTENIDAS A PARTIR DE CÁSCARAS DE HUEVO DE *CAIMAN LATIROSTRIS* PARA APLICACIONES EN BIOMATERIALES

Ana Clara Sánchez Dova¹, Magdalena Corpus Grust², Tamara G. Oberti¹, Melina Soledad Simoncini³, Juan Manuel Fernández^{2*}

1. Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CONICET. La Plata, Argentina

2. Laboratorio de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral (LIOMM), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CIC. La Plata, Argentina

3. Centro de Investigación Científica y de Transferencia Tecnológica a la Producción, CICYTTP-CONICET-Prov. ER-UADER, Diamante. Entre Ríos, Argentina

Resumen

Introducción: La ingeniería de tejido óseo requiere el desarrollo de biomateriales capaces de reproducir las funciones de la matriz extracelular y favorecer la regeneración ósea.

Objetivos: Obtener y caracterizar hidroxiapatita a partir del calcio presente en cáscaras de huevo de *Caiman latirostris*, promoviendo una estrategia innovadora y sustentable para el desarrollo de biomateriales, y evaluar de manera preliminar su biocompatibilidad mediante ensayos *in vitro*.

Materiales y métodos: En este estudio se sintetizó hidroxiapatita a partir de cáscaras de huevo de *Caiman latirostris*, provenientes del "Proyecto Yacaré" de la provincia de Santa Fe (Argentina), se evaluaron las propiedades fisicoquímicas de las cerámicas obtenidas con tratamiento térmico (800 °C, 2 h) y sin él, y se analizó su comportamiento biológico *in vitro*.

Resultados: El tratamiento térmico produjo un aumento significativo en el tamaño promedio de las partículas debido a su aglomeración, sin modificar de manera sustancial la relación

calcio-fósforo (Ca/P). Los análisis estructurales indicaron la formación de una hidroxiapatita carbonatada tipo AB, con ausencia de pirofosfato, favorable, según bibliografía, para la mineralización ósea. Los ensayos con células osteoblásticas MCET3-E1 mostraron que ambas cerámicas son biocompatibles y estimulan la proliferación celular en un rango específico de concentraciones, sin efectos citotóxicos en niveles más altos.

Conclusiones: El uso de cáscaras de huevo de *Caiman latirostris* representa un enfoque sustentable y alineado con los principios de la química verde, al valorar un residuo biológico natural, obtenido en el marco de un programa de conservación y uso sustentable de la especie, reduciendo así el impacto ambiental. No obstante, se requieren estudios complementarios de biocompatibilidad y ensayos *in vivo* para validar su seguridad y eficacia en aplicaciones clínicas en ingeniería de tejido óseo.

Palabras clave: cocodrilianos, hidroxiapatita carbonatada, ingeniería de tejido óseo, subproductos biológicos.

*E-mail: jmfernandez@biol.unlp.edu.ar



SYNTHESIS OF HYDROXYAPATITE-LIKE CERAMICS FROM CAIMAN LATIROSTRIS EGGSHELLS FOR BIOMATERIAL APPLICATIONS

Abstract

Introduction: Bone tissue engineering requires the development of biomaterials capable of reproducing the functions of the extracellular matrix and promoting bone regeneration.

Objectives: To obtain and characterize hydroxyapatite from the calcium present in *Caiman latirostris* eggshells, promoting an innovative and sustainable strategy for biomaterial development, and to preliminarily evaluate its biocompatibility through *in vitro* assays.

Materials and methods: In this study, hydroxyapatite was synthesized from *Caiman latirostris* eggshells obtained from the “Proyecto Yacaré” in Santa Fe Province (Argentina). The physicochemical properties of ceramics obtained with and without heat treatment (800 °C, 2 h) were evaluated, and their *in vitro* biological behavior was analyzed.

Results: Heat treatment produced a significant

increase in the average particle size due to agglomeration, without substantially modifying the Ca/P ratio. Structural analyses indicated the formation of AB-type carbonated hydroxyapatite, with no pyrophosphate detected, which, according to the literature, is favorable for bone mineralization. Assays using MCET3-E1 osteoblastic cells showed that both ceramics are biocompatible and stimulate cell proliferation within a specific concentration range, without cytotoxic effects at higher levels.

Conclusions: The use of *Caiman latirostris* eggshells represents a sustainable approach aligned with the principles of green chemistry, adding value to a natural biological waste material obtained within the framework of a conservation and sustainable-use program for the species, thereby reducing environmental impact. Nevertheless, additional biocompatibility studies and *in vivo* assays are required to validate their safety and efficacy for clinical applications in bone tissue engineering.

Keywords: biological by-products, bone tissue engineering, carbonated hydroxyapatite, crocodilians.

Introducción

Ante defectos críticos, la regeneración del tejido óseo presenta ciertas limitaciones, y la complejidad de este proceso convierte a las patologías que afectan la integridad estructural del esqueleto en un tema de importancia clínica y científica, impulsando el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el campo de la ingeniería de tejido.¹ Entre estas se destacan las fracturas complejas que no consolidan de manera espontánea, las resecciones tumorales que generan amplias pérdidas de tejido, y las infecciones graves como la osteomielitis, caracterizada por destrucción progresiva del hueso y dificultad para su recuperación funcional.^{2,3} Asimismo, defectos

asociados a traumatismos severos, enfermedades degenerativas como la osteoporosis avanzada, y fallos en implantes o prótesis representan escenarios en los cuales los tratamientos convencionales resultan insuficientes, evidenciando la necesidad de estrategias terapéuticas innovadoras que permitan una regeneración ósea efectiva y segura.^{3,4}

En este contexto, la Ingeniería de Tejido Óseo (ITO) emerge como una alternativa interdisciplinaria orientada a desarrollar andamios tridimensionales biocompatibles que promuevan la adhesión, proliferación y diferenciación de células osteogénicas, facilitando la regeneración del tejido mineralizado.⁵ Una de las aproximaciones más empleadas consiste en

el diseño de *biocomposites* formados por polímeros reforzados con cerámicas bioactivas, entre las que se destacan las apatitas cálcicas, y en particular la hidroxiapatita (HAP), por su similitud con la fase mineral del hueso, su biocompatibilidad y su capacidad osteoconductiva.^{5,6}

Las cerámicas tipo HAP cumplen un rol estructural y funcional clave cuando se incorporan a andamios de polímeros, actuando como refuerzo mecánico mediante el aumento de su rigidez y resistencia; y proporcionando señales químicas que favorecen la adhesión y diferenciación celular, guiando la regeneración ósea.⁵⁻⁸ Su presencia mejora la bioactividad, contribuye a la integración con el tejido circundante y permite la liberación controlada de iones calcio y fosfato, promoviendo la mineralización *in situ*.⁹

No obstante, la síntesis convencional de HAP y cerámicas afines a menudo depende de precursores químicos y procesos energéticamente costosos, generando subproductos contaminantes.^{10,11} En este escenario, la Química Verde ofrece un enfoque estratégico fundamental, promoviendo métodos de síntesis sostenibles, seguros y de bajo impacto ambiental, basados en la valorización de residuos biológicos. Aplicar estos principios en la obtención de cerámicas para ITO permite reducir la huella ecológica, disminuir costos y desarrollar biomateriales coherentes con los criterios de economía circular y sostenibilidad.¹²

Entre las fuentes naturales de calcio, las cáscaras de huevo constituyen un recurso altamente atractivo. En particular, la cáscara de huevo de *Caiman latirostris* (yacaré overo) posee una arquitectura microestructural jerarquizada y una elevada proporción de carbonato de calcio en forma de calcita, lo que la convierte en un precursor prometedor para la síntesis de cerámicas tipo HAP.¹³⁻¹⁵ Esta estrategia permite la valorización de desechos biológicos, reduce la dependencia de precursores sintéticos y combina innovación científica con conservación y sostenibilidad.

En este marco, la hipótesis central del presente estudio es que el calcio aislado de cáscaras de huevo de *Caiman latirostris* podrá ser aprovechado, en consonancia con los principios de la Química Verde, para la síntesis de hidroxiapatita (HAP), generando cerámicas con las propiedades mecánicas y bioactivas, adecuadas para ser utilizadas como nanorrefuerzos en andamios destinados a la Ingeniería de Tejido Óseo. El objetivo general consiste en la obtención y caracterización de hidroxiapatita a partir del calcio presente en dichas cáscaras, promoviendo una estrategia innovadora y sustentable para el desarrollo de biomateriales que respondan de manera integral a los desafíos clínicos, ambientales y tecnológicos actuales. Asimismo, se propone evaluar de manera preliminar su biocompatibilidad mediante ensayos *in vitro*.

Materiales y métodos

Tratamiento de las cáscaras

Como fuente de calcio se utilizaron cáscaras de huevo de *Caiman latirostris* obtenidas de huevos eclosionados, en el marco del programa de conservación y uso sustentable “Proyecto Yacaré” (provincia de Santa Fe, Argentina). Estas fueron exhaustivamente lavadas de forma manual con cepillo y agua destilada a 80 °C en ciclos de lavado consecutivos, hasta la eliminación de residuos orgánicos visibles, cambiando el agua en cada ciclo. Las cáscaras limpias se secaron en estufa a 80 °C, se molieron en mortero y se tamizaron (Sieve N.º 20) para homogeneizar el tamaño de partícula. Para la obtención de la cerámica se adaptó el protocolo descrito por Castro y colaboradores.¹⁶

Obtención de solución del precursor de Ca

Para la obtención del precursor de calcio se pesaron 11 g de cáscara tamizada, se disolvieron en 209 mL de HCl 0,8 M con agitación a 40 °C durante 1 hora. A continuación, la solución obtenida se filtró en caliente y se recuperó el



sobrenadante, que constituyó la solución de partida para la síntesis de hidroxiapatita. El rendimiento de obtención de Ca fue determinado gravimétricamente; para ello, una alícuota de la solución obtenida se trató con hidróxido de sodio (NaOH), provocando la precipitación de hidróxido de calcio (Ca(OH)_2), que luego fue secado y pesado. El rendimiento calculado para esta etapa fue de 16% de Ca(OH)_2 con respecto a la masa de cascara de huevo, valor que se tuvo en cuenta para los cálculos correspondientes para la obtención de hidroxiapatita.

Síntesis de la cerámica

La cerámica fue obtenida a partir de la solución del precursor de Ca, mantenida a 80 °C bajo agitación constante. Se adicionó ácido fosfórico (H_3PO_4) comercial (85%) en una proporción molar Ca/P de 1,67. La solución resultante se llevó a pH 11 mediante la adición gota a gota de hidróxido de amonio (NH_4OH) (1:1), observándose de inmediato la formación de un precipitado blanco. Este precipitado se mantuvo a 80 °C durante 2 horas y posteriormente se dejó madurar los cristales durante 48 horas, a temperatura ambiente. Luego de este tiempo, los cristales se recuperaron mediante centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos. Se realizaron dos lavados sucesivos con agua destilada, volviendo a suspender y centrifugar en cada ocasión. Finalmente, el sólido se secó en estufa a 80 °C durante 12 horas y se recuperó en forma de polvo fino. Este primer producto de síntesis que no recibió tratamiento térmico adicional se denominó STT, (sin tratamiento térmico). Con el fin de disminuir el contenido de agua y carbonato, una segunda porción de la cerámica fue sometida a 800° C durante 2 horas,¹⁷ denominada CTT (con tratamiento térmico). De esta manera, se obtuvieron dos muestras distintas que permiten evaluar el efecto del tratamiento térmico sobre las propiedades de la cerámica.

Caracterización estructural y química

Las muestras CTT y STT fueron observadas mediante microscopia electrónica de barrido

(SEM) con el objetivo de analizar el tamaño y morfología de la muestra. Se utilizó una cobertura conductora (oro) para la visualización de las muestras y la determinación de la composición elemental mediante espectroscopia de dispersión de energía (EDS) adosada a SEM para conocer la relación Ca/P y la relación C/(Ca+P). A partir de las imágenes obtenidas por SEM se evaluó el área de las partículas de las cerámicas, utilizando el programa libre ImageJ®.⁶ Por otro lado, las cerámicas fueron analizadas mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para la identificación de los grupos funcionales característicos de las cerámicas obtenidas.⁶ Para la lectura y análisis de los espectros FTIR se utilizó el programa Omnic®, de ThermoFisher.

Ensayos de biocompatibilidad

Los estudios de biocompatibilidad fueron realizados mediante ensayos de viabilidad de células preosteoblásticas MC3T3-E1 mediante exposición a concentraciones crecientes de las cerámicas en cultivo. Para ello, las células fueron cultivadas en medio DMEM con 10% suero fetal bovino (SFB) penicilina/estreptomicina (medio basal) a 37 °C en una atmósfera de 5% CO_2 , hasta alcanzar la confluencia (10 días de cultivo). Al cabo de este período, fueron tratadas con tripsina y 10.000 células fueron por pocillo sembradas sobre placas de cultivo con distintas concentraciones (0 (control), 0,0225, 0,045, 0,09, 0,18, 0,35 y 0,7 mg/mL) de las cerámicas utilizando DMEM con 1% de SFB. Luego de 24 horas de cultivo, las células fueron lavadas con *buffer* PBS y fijadas con solución de glutaraldehído 5% preparado en PBS. Posteriormente de retirar el fijador, las células se tiñeron con solución de cristal violeta. Para realizar la cuantificación de la tinción, el colorante fue disuelto en *buffer* glicina pH=3 y la densidad óptica fue medida en espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.¹⁸

Análisis estadístico

Los resultados son expresados como promedio $\pm$ SEM. El análisis estadístico de los resultados fue realizado mediante el t-test de Student para las muestras asumiendo varianzas iguales, o mediante ensayos de ANOVA usando un único factor para comparar las muestras, según corresponda. Los datos se consideran significativamente diferentes cuando la probabilidad es $p < 0,05$. El procesamiento y análisis de los datos en todos los casos se realizaron con el software GraphPad InStat® y GraphPad Prism®.

Resultados y discusión

La Ingeniería de Tejidos es una ciencia interdisciplinaria en la cual se utilizan biomateriales que, al ser implantados en un órgano dañado, sirven de guía y soporte para su reparación. En el caso particular del tejido óseo, el diseño de estos biomateriales se orienta hacia un enfoque biomimético, buscando reproducir las funciones de la matriz extracelular ósea, compuesta principalmente por fibras de colágeno tipo I y por una fase mineral basada en fosfatos cálcicos. En este contexto, la incorporación de hidroxiapatita, o cerámicas similares, en los andamios se vuelve esencial, ya que dicho componente mineral no solo aporta resistencia y rigidez similares a las del hueso natural, sino que además estimula la adhesión celular, promueve la osteoconducción y facilita la diferenciación de células madre mesenquimales hacia linajes osteogénicos, potenciando así los procesos de regeneración y reparación ósea.⁵⁻⁸ En este trabajo se utilizaron cáscaras de huevo de *Caiman latirostris*, proveniente de un programa de conservación y uso sustentable de la provincia de Santa Fe (Argentina), como fuente de calcio para la obtención de hidroxiapatita. Estas cáscaras están constituidas por ornamentaciones columnares de calcita, un mineral derivado del calcio; considerando que, en cada nido, la hembra deposita entre 25 y 40 huevos, se convierten en una fuente

atractiva y sustentable para la síntesis de hidroxiapatita.¹³⁻¹⁵

Adicionalmente, si bien la obtención de hidroxiapatita a partir de cáscaras de huevo aviar ha sido ampliamente reportada, no se han encontrado antecedentes del uso de cáscaras de *Caiman latirostris* como precursor, lo que confiere a este enfoque un carácter novedoso. La elección también se vincula con los programas de rancheo que se llevan a cabo en la Argentina, el cual se basa en la colecta de huevos en la naturaleza, para la posterior incubación artificial, obteniendo un número mayor de crías de las que se hubieran obtenido en la naturaleza, además de una gran cantidad de cáscaras de huevos sin uso hasta el momento, generando residuos biológicos actualmente no aprovechados.¹⁹ De esta manera, considerando que su composición ya ha sido estudiada, su valorización como fuente para biomateriales podría aportar un incentivo adicional a los programas de manejo y conservación de esta especie¹⁴. Asimismo, este enfoque podría extenderse a otros emprendimientos con cocodrilianos en el ámbito global, transformando un residuo en un subproducto de valor con aplicaciones en salud y contribuyendo simultáneamente a la sostenibilidad y conservación de estas especies.

En la figura 1 se presentan las micrografías de SEM con dos aumentos (200x y 667x de las cerámicas obtenidas sin tratamiento térmico (STT) y con tratamiento térmico (CTT). En ambas cerámicas se encontró una amplia distribución en el tamaño de partículas, lo cual se atribuye a que no se realizó separación por tamaño, ni durante el proceso de obtención ni después de él. En la tabla 1 se presentan los valores de tamaño promedio de partícula expresado en μm^2 en tres poblaciones de partículas distintas, medidas a partir de las imágenes de SEM de la figura 1. Se encontró que el área de las partículas de CTT fue significativamente superior a STT para las tres regiones de tamaño estudiadas ($p < 0,001$), probablemente por aglomeración debido a la pérdida de agua durante el proceso de calentamiento.

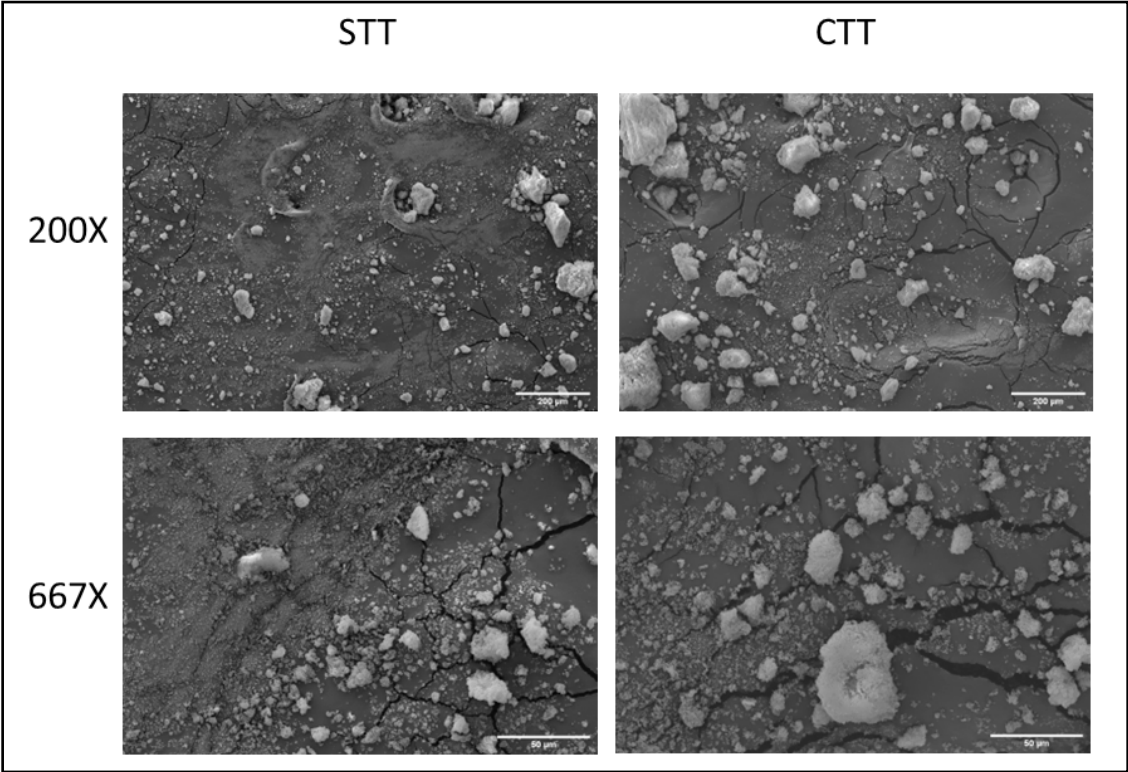


Figura 1. Micrografías de SEM de las cerámicas sin tratamiento térmico (STT) y con tratamiento térmico (CTT) a 200 y 667 X.

Tabla 1. Tamaño de partículas promedio de las cerámicas STT y CTT en tres rangos de poblaciones distintos. ***: $p < 0,001$ con respecto a STT.

Rango de tamaño de población de partículas (μm^2)	STT	CTT
0,1 y 1,0	$0,328 \pm 0,003$	$0,357 \pm 0,006$ ***
1,0 y 10,0	$2,61 \pm 0,01$	$3,20 \pm 0,08$ ***
Mayores de 10,0	$58,93 \pm 7,05$	$179,16 \pm 30,89$ ***

El efecto del tamaño de partículas en función de la temperatura ha sido comprobado por otros investigadores. Se ha descrito que el aumento de temperatura produce un aumento del tamaño de partícula causado por coalescencia de partículas de menor tamaño de hidroxiapatita provenientes de 3 métodos distintos de síntesis.²⁰ Por otro lado, un estudio indicó que el tratamiento térmico a 1000 °C producía un aumento significativo en el

tamaño de partícula de hidroxiapatita y una disminución en la superficie por gramo de partícula, aumentando aún más esta diferencia a 1100 °C,²¹ un comportamiento similar ha sido informado al calcinar HAP a 950 °C.²² Este comportamiento depende tanto de la temperatura como del catión que reemplaza al Ca en la apatita.²³ En el presente estudio, al evaluar el porcentaje de coeficiente de variación (%CV, $\text{SEM} \times 100/\text{promedio}$) se encontró

que el tratamiento térmico produjo un aumento en la dispersión de los tamaños de partículas para todas las poblaciones (Figura 2A).

En la figura 2B se muestra la relación de los elementos (C, Ca y P) hallados en las cerámicas. Se observó que no hubo diferencia significativa en la relación Ca/P que fue $1,49 \pm 0,01$ y

$1,44 \pm 0,02$ para STT y CTT, respectivamente. Sin embargo, la relación de carbono con respecto a calcio más fósforo disminuyó significativamente de $6,89 \pm 0,48$ a $4,45 \pm 0,55$ debido al tratamiento térmico.

En la figura 3 se presentan los espectros de FTIR para ambas cerámicas y en la tabla 2 las

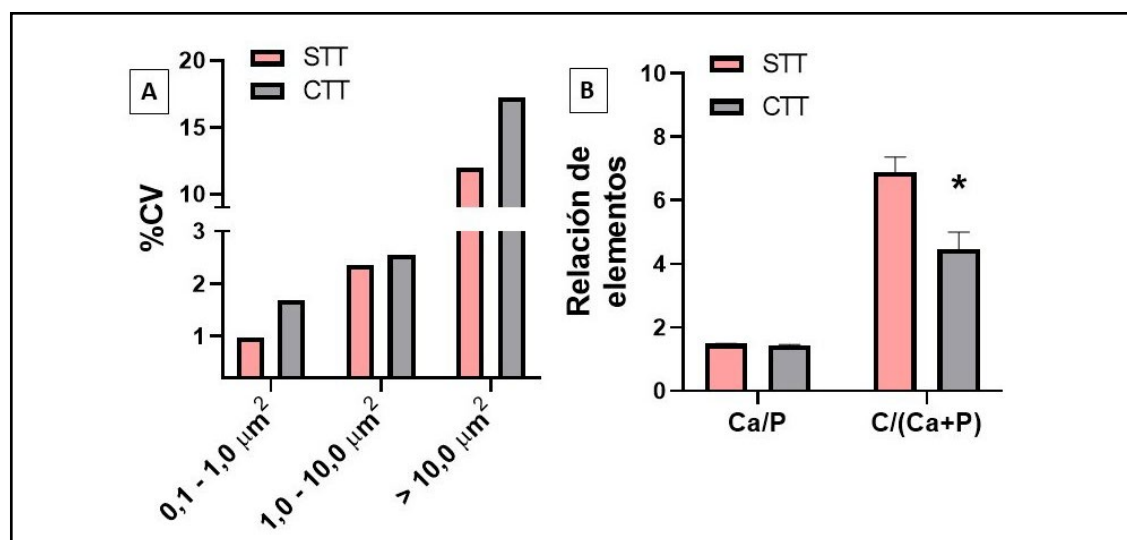


Figura 2. Distribución de las poblaciones de tamaño expresadas como %CV (A). Relación de elementos Ca/P y C/(Ca + P) que componen las cerámicas (B). *: $p < 0,05$ vs. STT.

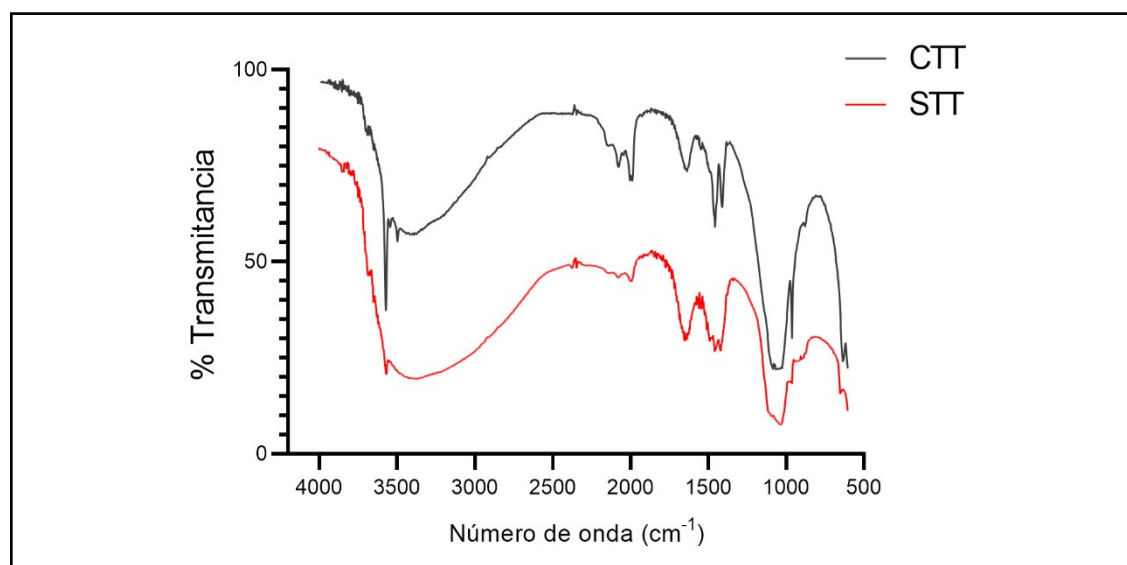


Figura 3. Espectros de FTIR de ambas cerámicas.



Tabla 2. Asignaciones de número de ondas de FTIR

N.º de onda (cm ⁻¹)	Asignación	STT	CTT	Referencia
725	Pirofosfato	Ausente	Ausente	22
960-1100	Frecuencias de vibración de (PO ₄) ⁻³	Presente	Presente	22, 31-33
3571, 632	OH ⁻ asociada a apatita	Presente	Aumentada	31-33
1620-1660, 3430-3456	Agua adsorbida	Presente	Disminuida	16, 32, 36, 37
878, 1465, 1542	Sustitución tipo A de (CO ₃) ⁻²	Presente	Presente	34
872-874, 1412, 1462	Sustitución tipo B de (CO ₃) ⁻²	Presente	Presente solo 1412 y 1462	16, 34
2010-2400	CO ₂ del aire	Presente	Presente	17, 34, 35

asignaciones correspondientes. Se observó que el tratamiento térmico produjo una disminución de la banda asociada al agua adsorbida en relación con las señales de fosfato, lo que podría explicar la aglomeración de las partículas. Por otro lado, la banda representativa del pirofosfato está ausente, que aparece por interconversión de los grupos fosfatos de la cerámica debido a la temperatura.²² Desde el punto de vista de la aplicación es importante evitar la formación del pirofosfato en la cerámica, ya que se ha demostrado que es un inhibidor de la mineralización de la matriz extracelular ósea por varios mecanismos descritos, por ejemplo: inhibición directa de la cristalización de la hidroxiapatita, inhibición de la enzima fosfatasa alcalina tejido no específica y la expresión de osteopontina.²⁴ Se observaron señales pertenecientes a los grupos (PO₄)⁻³ y (OH)⁻ asociados a hidroxiapatitas y otras asociadas a ion carbonato ((CO₃)⁻²). A pesar de que las bandas 872-874 (cm⁻¹) están ausentes luego del tratamiento térmico, los espectros de FTIR demuestran que el (CO₃)⁻² sustituiría a (OH)⁻ dando una carbohidroxiapatita tipo A y al (PO₄)⁻³ dando una carbohidroxiapatita tipo B, lo que demuestra que se obtuvo una

cerámica símil hidroxiapatita deficiente de calcio carbonatada tipo AB.^{22,24}

Por último, resulta necesario que los componentes de los materiales empleados como andamios celulares sean biocompatibles con el tejido y de esta forma no generen reacciones adversas.^{1,4} De acuerdo con esto se realizó el ensayo de proliferación de células del linaje osteoblástico MCET3-E1 empleando concentraciones crecientes de la cerámica hasta 0,7 mg/mL, ya que es la mayor concentración posible para obtener una dispersión estable de la cerámica en medio de cultivo. Como se observa en la figura 4, ambas cerámicas promovieron significativamente la proliferación de las células en las concentraciones comprendidas entre 0,02 y 0,18 mg/mL, con respecto al control (sin cerámica); el máximo del efecto con la concentración fue 0,09 mg/mL para ambas muestras. La mayor proliferación celular observada en bajas concentraciones del biomaterial en comparación con el control podría explicarse por un efecto dosis-dependiente. En concentraciones reducidas, la liberación de iones (como Ca²⁺ y PO₄³⁻) desde la hidroxiapatita puede generar un microambiente favorable que estimula la

actividad metabólica y la proliferación celular. Se ha demostrado que las concentraciones moderadas de Ca^{2+} favorecen la proliferación y supervivencia de osteoblastos, mientras que las concentraciones más elevadas pueden inducir efectos citotóxicos o promover diferenciación en lugar de proliferación.²⁶ Cabe remarcar que, en el presente estudio, las mayores concentraciones de cerámicas ensayadas no produjeron cambios en la proliferación de las células con respecto al control, es decir, no tuvieron efectos tóxicos, ni mitogénicos. Otros autores han evaluado el efecto de las cerámicas similares a hidroxiapatitas sobre el comportamiento de las células. Aunque no realizan una curva dosis-respuesta, Pieters y cols. demostraron que se produce aumento de proliferación luego de 24 horas en relación con el porcentaje de $(\text{CO}_3)^{-2}$ presente en la cerámica.²⁷ Un estudio previo describe que el efecto de las hidroxiapatitas sobre las células MCET3-E1 puede ser potenciado si las cerámicas son recubiertas con proteínas.²⁸ Otra investigación estudió el comportamiento de células de médula ósea humana sobre discos de hidroxiapatita e hidroxiapatita carbonatada.

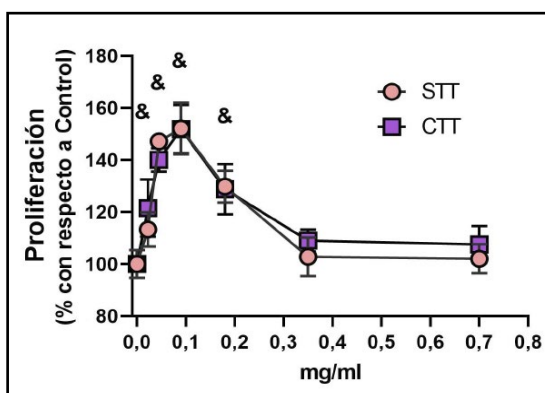


Figura 4. Curva de proliferación dosis-respuesta de las células MCET3-E1. &: $p < 0,01$ vs. Control, 0,35 y 0,7 mg/mL. El control corresponde a células cultivadas en ausencia de cerámica en el medio de cultivo.

Aunque no hubo diferencia significativa durante la proliferación de las células, encontraron que a 7, 14 y 21 días, las células expresaban mayor actividad de marcadores de actividad osteoblástica.²⁹ Además del tamaño de las partículas de las cerámicas, se ha descrito que la forma de estas también puede afectar la actividad de las células.³⁰ Si bien en el presente estudio no hubo cambio en la forma de las partículas, siendo del tipo circulares tanto para STT como para CTT (véase Figura 1), las diferencias en el tamaño no han producido cambios en la proliferación celular.

En conclusión, las cerámicas obtenidas a partir de cáscaras de huevo de *Caiman latirostris* constituyen una fuente única, sustentable y económicamente atractiva de calcio para la síntesis de hidroxiapatita, aprovechando un residuo biológico abundante y no utilizado. El tratamiento térmico aplicado permitió modificar el tamaño y la distribución de las partículas sin alterar significativamente la relación Ca/P, mientras que los análisis estructurales se condicen con la formación de una hidroxiapatita carbonatada tipo AB. Los ensayos *in vitro* con células osteoblásticas demostraron que los materiales son capaces de estimular la proliferación celular dentro de un rango específico de concentraciones, sin efectos citotóxicos. Los resultados preliminares de las cerámicas demuestran que estas resultan ser biocompatibles bajo las condiciones evaluadas. Este enfoque se enmarca en los principios de la Química Verde, al valorizar subproductos naturales y reducir el impacto ambiental de la síntesis de biomateriales.

No obstante, a pesar de estos resultados prometedores, aún es necesario realizar estudios adicionales de biocompatibilidad y ensayos *in vivo* que permitan confirmar la seguridad y eficacia de estas cerámicas en aplicaciones clínicas de ingeniería de tejido óseo.

Recibido: noviembre 2025

Aceptado: mayo 2026

Publicado: julio 2026



Agradecimientos: este trabajo fue subsidiado por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). ASD es Lic. en Biotecnología y Biología Molecular de la FCE, UNLP; MCG es estudiante de Lic. en Biotecnología y Biología Molecular de la FCE, UNLP. TGO, MSS y JMF son miembros de la Carrera del Investigador del CONICET.

Contribuciones de autores: Conceptualización, Metodología, Supervisión, Validación: ML, VED, JB, LRB. Curación de datos, Investigación,

Visualización: ML, AV, LV, PML. Análisis formal, Redacción – borrador original: ML, AV, LV. Redacción – revisión y edición: ML, AV, LV, PML, VED, JB, LRB.

Conflictos de intereses: los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Financiamiento: los autores declaran que no ha recibido ningún financiamiento o apoyo económico para la realización de este estudio y la preparación de este artículo.

Referencias

1. Marotta MV, Rojas AH, Oberti TG, Fernández JM. Obtención, caracterización y biocompatibilidad de hidrogeles poliméricos para Ingeniería de Tejidos: Estudio preliminar. *Actualizaciones en Osteología* 2024;20(1):9-23.
2. Gehrke AE, Mendoza-Bertelli A, Ledo C, et al. Neutralization of Staphylococcus aureus Protein A Prevents Exacerbated Osteoclast Activity and Bone Loss during Osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2023;(67):e01140-22.
3. Torres ML, Cuba AH, Oberti TG, Fernández JM. Alginate-HEMA Hydrogels as Promising Biomaterials for Bone Regeneration: In Vitro and In Vivo Studies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2024;112(11): e35493.
4. Hurtado Cuba AG, Borgeaud M, Belluzo MS, Oberti TG, Fernández JM. Estudio de Biocompatibilidad de Matrices Poliméricas Combinadas, Responsivas al pH, con Potencial Aplicación en Ingeniería de Tejido Óseo. *Actual. Osteol* 2023;19(2):128-43.
5. Selim M, Mousa HM, Abdel-Jaber GT, Barhoum A, Abdal-hay A. Innovative designs of 3D scaffolds for bone tissue regeneration: Understanding principles and addressing challenges. *European Polymer Journal* 2024;215:113251.
6. Fernández JM, Molinuevo MS, Cortizo MS, Cortizo AM. Development of an osteoconductive PCL-PDIPF-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2011;5: e126-e135.
7. Bauso LV, La Fauci V, Longo C, Calabrese G. Bone Tissue Engineering and Nanotechnology: A Promising Combination for Bone Regeneration. *Biology* 2024;13:237.
8. Fernández JM, Cortizo MS, Cortizo AM, Abraham GA. Osteoblast Behavior on Novel Porous Polymeric Scaffolds. *J. Biomater. Tissue Eng* 2011;1:86-92.
9. Garimella A, Ghosh SB, Bandyopadhyay-Ghosh S. Biomaterials for bone tissue engineering: achievements to date and future directions. *Biomedical Material* 2025;20:012001.
10. Yadav MK, Shukla RH, Prashanth KG. A comprehensive review on development of waste derived hydroxyapatite (Hap) for tissue engineering application. *Materials Today: Proceedings* 2023.
11. Gnanasekaran R, Yuvaraj D, Mathan Muthu DM, et al. Extraction and characterization of biocompatible hydroxyapatite (Hap) from red big eye fish bone: Potential for biomedical applications and reducing biowastes.

- Sustainable Chemistry for the Environment* 2024;7:100142,
12. Zamri MFMA, Bahru R, Amin R, et al. Waste to health: A review of waste derived materials for tissue engineering. *Journal of Cleaner Production* 2021; 290: 125792.
 13. Cedillo-Leal C, Simoncini MS, Leiva PML, Larriera A, Lang JW, Piña CI. Eggshell structure in Caiman latirostris eggs improves embryo survival during nest inundation. *Proc R Soc B* 2017; 284: 20162675.
 14. Fernández MS, Simoncini MS, Dyke G. Irregularly calcified eggs and eggshells of Caiman latirostris (Alligatoridae: Crocodylia). *Naturwissenschaften* 2013;100(5):451-7.
 15. Piazza MV, Fernández MS, Leiva PML, Piña CI, Simoncini MS. "Intracascaral space" an eggshell structure of *Caiman latirostris* eggs. *Sci Rep* 2021;11:5579.
 16. Castro MAM, Portela TO, Correa GS, et al.. Synthesis of hydroxyapatite by hydrothermal and microwave irradiation methods from biogenic calcium source varying pH and synthesis time. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio* 2022; 61:35-41.
 17. Kamalanathan P, Ramesh S, Bang LT, et al. Synthesis and sintering of hydroxyapatite derived from eggshells as a calcium precursor. *Ceramics International* 2014;40(10):16349-59.
 18. Fernández JM, Molinuevo MS, Sedlinsky C, Schurman L, Cortizo AM, McCarthy AD. Strontium ranelate prevents the deleterious action of advanced glycation endproducts on osteoblastic cells via calcium channel activation. *Eur J Pharmacol* 2013; 706(1-3):41-7.
 19. Larriera A, Imhof A. En: Bolkovic, M L, Ramadori D (eds.). Manejo de Fauna Silvestre en la Argentina. Programas de uso sustentable. Buenos Aires: Dirección de Fauna Silvestre, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable; 2006. pp. 51-64.
 20. Mostafa NY. Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes. *Materials Chemistry and Physics* 2005;94:333-41.
 21. Amin AMM, Besisa DHA, El-Amir AAM, Zaki ZI, Ahmed YMZ. Role of heat treatment of hydroxyapatite powder prior to suspension preparation on the suspension flow behavior. *Open Ceramics* 2022;9:100239.
 22. Klecandova L, Sliva A, Šindler M, et al. Effect of Processing on Structural and Morphological Changes of Hydroxyapatite-Based Materials. *Chemistry Select* 2025;10: e202405109.
 23. Diichuk V, Diichuk I. Thermal treatment effect on the particle size distribution of alkaline earth metals hydroxyapatite. *Scientiae Radices* 2023; 2(4):309-18.
 24. Addison WN, Azari F, Sørensen ES, Kaartinen MT, McKee MD. Pyrophosphate Inhibits Mineralization of Osteoblast Cultures by Binding to Mineral, Up-regulating Osteopontin, and Inhibiting Alkaline Phosphatase Activity. *J Biol Chem*. 2007;282(21):15872-83.
 25. Jaber H, Mousa MH, Qadir A, et al. Comprehensive investigation into thermal stability of AB-type bio- carbonate hydroxyapatite synthesized via heat-treated bovine bone. *Open Ceramics* 2024;20:100701.
 26. Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, et al. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* 2005;26(23): 4847-55.
 27. Pieters IY, Van den Vreken NMF, Declercq HA, Cornelissen MJ, Verbeeck RMH. Carbonated apatites obtained by the hydrolysis of monetite: Influence of carbonate content on adhesion and proliferation of MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Acta Biomaterialia* 2010;6:1561-8.
 28. Tsang EJ, Arakawa CK, Zuk PA, Wu BM. Osteoblast Interactions within a Biomimetic Apatite Microenvironment. *Ann Biomed Eng* 2011; 39(4):1186-200.



29. Nagai H, Kobayashi-Fujioka M, Fujisawa K, et al. Effects of low crystalline carbonate apatite on proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow cells. *J Mater Sci: Mater Med* 2015; 26:99.
30. Chou YF, Huang W, Dunn JCY, Miller TA, Wu BM. The effect of biomimetic apatite structure on osteoblast viability, proliferation, and gene expression. *Biomaterials* 2005;26:285-95.
31. Poinern GJE, Brundavanam R, Le XT, Djordjevic S, Prokic M, Fawcett D. Thermal and ultrasonic influence in the formation of nanometer scale hydroxyapatite bio-ceramic. *Int J Nanomedicine* 2011;6, 2083-95.
32. Jamil M, Elouahli A, Abida F, et al. Development of Triphasic Hydroxyapatite/ (α and β)-Tricalcium Phosphate Based Composites by Sintering Powder of Calcium-Apatite in the Presence of Montmorillonite. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* 2020; 30(6):2489-98.
33. Ruiz J, Moreno D, Copete H, Vargas F, López ME. Calcium phosphate cements improved by addition of carbonated Hydroxyapatite type B. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio* 2023; 62(4):315-28.
34. Sabu U, Logesh G, Rashad M, Joy A, Balasubramanian M. Microwave assisted synthesis of biomorphic hydroxyapatite. *Ceramic International* 2019; 45(6):6718-22.
35. Ramesh S, Natasha AN, Tan CY, et al. Direct conversion of eggshell to hydroxyapatite ceramic by a sintering method. *Ceramic International* 2016;42(6): 7824-9.
36. Gheisari H, Karamian E, Abdellahi M. A novel hydroxyapatite –Hardystonite nanocomposite ceramic. *Ceramics International* 2015;41:5967-75.
37. Kesmez O. Preparation of Anti-bacterial Biocomposite Nanofibers Fabricated by Electrospinning Method. *Journal of the Turkish Chemical Society Chemistry* 2020;7(1):125-42.