



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y MATERIALES

**Síntesis de compuestos tipo jarosita para posibles aplicaciones en
ingeniería tisular ósea.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS
MATERIALES**

PRESENTA:

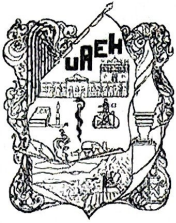
M. en C. Juan Rubén Serralde Lealba

Directores de tesis:

Dr. Eduardo Cerecedo Sáenz

Dr. Raúl Rosales Ibáñez

Mayo 2023



Mineral de la Reforma, Hgo., a 8 de mayo de 2023

Número de control: ICBI-D/465/2023
 Asunto: Autorización de impresión.

MTRA. OJUKY DEL ROCIO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

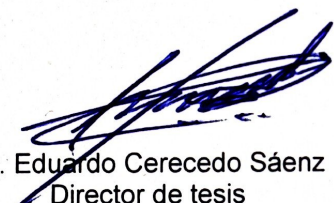
El Comité Tutorial de la tesis titulada **“Síntesis de compuestos tipo Jarosita para posibles aplicaciones en ingeniería tisular ósea”** realizado por el sustentante **Juan Rubén Serralde Lealba** con número de cuenta **195572** perteneciente al programa de **Doctorado en Ciencias de los Materiales (tradicional)**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que el sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente
 “Amor, Orden y Progreso”


El Comité Tutorial


 Dr. Eduardo Cerecedo Sáenz
 Director de tesis


 Dr. Raúl Rosales Ibañez
 Codirector


 Dr. Juan Hernández Ávila
 Titular


 Dr. Eleazar Salinas Rodríguez
 Suplente


 Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval
 Director del ICBI



OAAS/IBO

Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
 Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
 México. C.P. 42184
 Teléfono: 771 71 720 00 ext. 2231 Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx



AGRADECIMIENTOS

Dedico esta tesis a:

MIS PADRES.

ALEJANDRO SERRALDE GARCÍA Y MARIELA LEALBA GUADARRAMA que han sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores. Brindándome ese apoyo incansable en cualquier circunstancia, inculcándome valores que hoy poseo; por estar conmigo en la buenas y las malas, por todos esos desvelos que hoy culminan en este trabajo que también es suyo.

A ustedes hermanos **ALEJANDRO SERRALDE LEALBA Y SERGIO SERRALDE LEALBA**, por el apoyo moral que durante mis estudios me brindaron en el logro de un importante objetivo en mi vida.

A mi Comité Tutorial, **DR. EDUARDO CERECEDO SÁENZ, DR. RAÚL ROSALES IBÁÑEZ, DR. JUAN HERNÁNDEZ ÁVILA, DR. ELEAZAR SALINAS RODRÍGUEZ**. Quienes confiaron en mí, me brindaron sus conocimientos y apoyo en estos años. Incluso en la pandemia

MTRA VALERIA VOLPI LEON

Por el tiempo, dedicación y ayuda en la redacción y recolección de datos. Así como su apoyo moral e inspiración.

MTRO ALBERTO ARENAS FLORES

Que en paz descansa y quien me ayudó en el análisis de los datos por difracción y FTIR. Sus conocimientos perdurarán a través de la investigación.

A todo el personal académico técnico y administrativo, que facilitó mi desempeño en el Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales y la Unidad Central de Laboratorios de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, UAEH. Así como en el anexo de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM. Principalmente al equipo de trabajo de la clínica: Jio, Arely y Amai

A todos ellos por haber sido parte de nuestra formación académica y este camino que hoy concluye satisfactoriamente en esta etapa de formación por medio de este trabajo.
GRACIAS.

-Juan Rubén Serralde Lealba

INDICE

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	x
I. INTRODUCCIÓN	xi
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Jarosita	1
1.2 Minerales de la familia jarosita	2
1.3 La jarosita potásica.....	3
1.4 Tejido óseo.....	5
1.5 Ingeniería de tejidos.....	9
1.5.1 Células troncales mesenquimales	10
Células troncales de pulpa dental porcina	12
Células troncales de folículo dental. (CTFD).....	13
Biomateriales (andamios)	16
1.5.3 Osteoinducción	20
1.6 Citotoxicidad	21
1.7 Proliferación celular	22
1.8 Ensayo MTT	23
2. ANTECEDENTES	25
2.1 Jarositas.....	25
2.2 Principales materiales osteoinductores	26
3. METODOLOGÍA	30
3.1 Síntesis de jarositas de potasio dopadas.....	31
3.2 Caracterización de las muestras.....	33
3.2.1 Difracción de Rayos X.....	33
3.2.2 Microscopía Electrónica de Barrido	34
3.2.3 Espectroscopía FTIR	35
3.3 Ensayos biológicos de las jarositas	36
3.3.1 Ensayo MTT	36
3.3.2 Ensayo de diferenciación osteogénica	39
4. RESULTADOS	42
4.1 Síntesis de las jarositas de potasio dopadas	42
4.2 Composición química	43
4.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido MEB	43
4.2.1.1 Jarosita de Potasio dopada con Calcio JKCa	43
4.2.1.2 Jarosita de Potasio dopada con el doble de Calcio JKCa2	45
4.2.1.3 Jarosita de Potasio dopada con Calcio, Estroncio y Magnesio JKAlI	47
4.2.2 Espectroscopía FTIR	50
4.3 Caracterización mineralógica	53

4.3.1 Difracción de Rayos X.....	53
4.3.1.1 Tamaño de cristal y porcentaje de cristalinidad.....	55
4.3.1.1.1 Cristalinidad JKCa	56
4.3.1.1.2 Cristalinidad JKCa2	58
4.3.1.1.3 Cristalinidad JKAlI	61
4.4 Ensayos biológicos de las jarositas	64
4.4.1 Ensayo MTT	64
4.4.2 Diferenciación osteogénica	65
5. CONCLUSIONES.....	70
6. REFERENCIAS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Jarosita localizada en Barranco de Jaroso, Sierra Almagrera, Cuevas del Almanzora, Almería, España (imagen obtenida de https://mineral-s.com/jarosita).....	1
Figura 2. Imagen tomada de Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Donde se muestra a estructura de jarosita del octaedro de FeO_6 se une a los tetraedros de SO_4 (comparte esquinas con ellos), formando láminas perpendiculares al eje c, con iones del sitio A (p. ej., Ag, K, Na, Pb y H_3O) ubicados entre el tetraedro-octaedro- láminas tetraédricas. (Cogram, 2018).	4
Figura 3. Micrografía de Microscopio Electrónico de Barrido de una jarosita de potasio sintética . (Smith et al, 2006).	4
Figura 4. Relaciones topográficas entre las células óseas. (Modificado de un dibujo de T. Chambers) (Marks y Popoff, 1988).	5
Figura 5. Representación de Osteona. Imagen tomada de https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=82640872	6
Figura 6. Células óseas. Imagen tomada de.....	7
Figura 7. Ejemplo de presencia de placas y tornillos para conseguir una estabilidad absoluta en una fractura de hueso largo, sin movilidad alguna para iniciar una rehabilitación adecuada. Imagen modificada de (Cognet et al, 2009).....	8
Figura 8. Tríada de ingeniería de tejidos. Los andamios, las células y los factores bioactivos se utilizan de forma aislada o en combinación para imitar el tejido deseado.....	9
Figura 9. Inicio de la organogénesis en el embrión (Gastrulación) (Imagen tomada de https://www.reproduccionasistida.org/quinta-semana-de-embarazo/).	11
Figura 10. Obtención de células troncales de pulpa dental porcina.	13
Figura 11. Germen dental completo con folículo dental, papila/pulpa dental y tejido dental mineralizado ya desarrollado (esmalte, dentina) antes de la erupción dental y el desarrollo de la raíz dental (Morsczeck, 2022).	14

Figura 12. Biomateriales que se aplican principalmente en ingeniería de tejidos y sus características (Xie et al., 2020).	19
Figura 13. Ejemplo de ensayo de proliferación celular.	22
Figura 14. Ensayo MTT para determinar viabilidad celular.	24
Figura 15. Cristal de jarosita de pie sobre barita encontrada en la mina “La Estrella, en las cuevas de Almanzura en Almería, Andalucía, España.(Bourgoin V., 2011).	25
Figura 16. Cristal de Hidroxiapatita (fosfato de calcio). Imagen tomada de https://wikiimg.tojsiabtv.com/wikipedia/commons/thumb/f/f8/Hydroxylapatite-338779.jpg/440px-Hydroxylapatite-338779.jpg	27
Figura 17. Reactivos utilizados para la síntesis de los compuestos tipo jarosita de potasio dopados.	31
Figura 18. Esquema representativo de la síntesis de jarositas de potasio dopadas, donde se aprecia el equipo y material utilizado para la realización de su síntesis.	32
Figura 19. Filtrado del material obtenido para la eliminación de líquido y exceso de sulfatos. A) Se aprecia el sistema de filtrado por vacío mientras que en la imagen B) se puede observar agua desionizada a punto de ebullición para la eliminación de sulfatos.	33
Figura 20. Difractómetro de Rayos X Equinox 2000 (INEL, Artenay, Francia) con radiación $\text{CoK}\alpha 1$ (1.79026 Å).	34
Figura 21. Microscopio Electrónico de Barrido JEOL modelo JSM-6300.	35
Figura 22. FTIR Perkin Elmer Frontier.	35
Figura 23. protocolo de ensayo MTT modificado donde los cristales formados se filtraban a través de unas puntas con filtro para evitar que el polvo de jarosita pasara a los pocillos donde se realizaría la lectura de la placa.	37
Figura 24. Prototipo de acero inoxidable para el control de medición de la cantidad de jarosita a evaluar.	37
Figura 25. Distribución de los grupos para el ensayo de MTT; 1) DMEM; 2) Jarosita + PBS; 3) Jarosita + DMEM; 4) Células + DMEM; 5) Células + Jarosita + DMEM.	38

Figura 26. Caja de 24 pozos con los grupos a evaluar; grupo A: células + DMEM; grupo B: células + jarosita + DMEM; grupo C: células + jarosita + medio de diferenciación osteogénico.	39
Figura 27. Caja de 96 pozos con los grupos a evaluar; grupo A: células + DMEM; grupo B: células + jarosita 1.5mm ³ +DMEM; grupo C: células + jarosita 1.5 mm ³ + medio de diferenciación osteogénico; grupo D: células + jarosita 3.0 mm ³ + DMEM; grupo E: células + jarosita 3.0 mm ³ + medio de diferenciación osteogénico; grupo F: células + jarosita 4.5 mm ³ + DMEM; grupo G: células + jarosita 4.5 mm ³ + medio de diferenciación osteogénico; grupo H: células + jarosita 6.0 mm ³ + DMEM; grupo I: células + jarosita 6.0 mm ³ + medio de diferenciación osteogénico.	41
Figura 28. Muestras de compuestos tipo jarosita dopados obtenidos tras la síntesis.	43
Figura 29. Micrografía de la muestra JKCa donde se aprecia la morfología cuasi esférica de las partículas de jarosita solas o aglomerándose alrededor de algunos sulfatos de calcio de forma cilíndrica.....	44
Figura 30. Espectro EDS (SEM) que muestran la composición química semicuantitativa del compuesto tipo jarosita dopada con calcio (JKCa)	44
Figura 31. Mapeo realizado en la muestra de JKCa donde se puede apreciar la presencia de los elementos S, Fe, K y Ca.....	45
Figura 32. Micrografía de la muestra JKCa2 donde se aprecia la morfología aún cuasi esférica de las partículas de jarosita solas, pero en mayor cantidad aglomeradas alrededor de algunos sulfatos de calcio de forma cilíndrica.	46
Figura 33. Espectros EDS (SEM) que muestran la composición química semicuantitativa de los compuestos tipo jarosita dopados: (a) JKCa; (b) JKCa2; y (c) JKAl.	46
Figura 34. Mapeo realizado en la muestra de JKCa2 donde se puede apreciar la presencia de los elementos S, Fe, K y Ca.	47
Figura 35. Micrografía de la muestra JKCa2 donde se aprecia la morfología aún cuasi esférica de las partículas de jarosita solas, pero en mayor cantidad aglomeradas alrededor de algunos sulfatos de calcio de forma cilíndrica.	48

Figura 36. Espectros EDS (SEM) que muestran la composición química semicuantitativa de los compuestos tipo jarosita dopados: (a) JKCa; (b) JKCa2; y (c) JKAlI.	48
Figura 37. Mapeo realizado en la muestra de JKAlI donde se puede apreciar la presencia de los elementos S, Fe, K, Ca, Sr y Mg.....	49
Figura 38. Espectros FTIR de: (a) jarosita de potasio, (b) JKCa, (c) JKCa2 y (d) JKAlI	51
Figura 39. Espectros comparativos obtenidos (a–d) para el correspondiente espectro de Jarosita de Potasio.	52
Figura 40. Espectros de difracción de rayos X para los compuestos tipo jarosita dopados: (a) JKCa; b) JKCa2c) JKAlI.....	54
Figura 41. Determinación de los valores 2θ y FWHM por software AutoCad 2021 para determinar tamaño de cristal.....	56
Figura 42. Porcentaje de cristalinidad JKCa.	58
Figura 43. Porcentaje de cristalinidad JKCa2.	60
Figura 44. Porcentaje de cristalinidad JKAlI.....	62
Figura 45. Representación de la estructura cristalina de a) la jarosita potásica, y b) la jarosita potásica dopada con Ca.....	63
Figura 46. Ensayo de citotoxicidad (MTT) de células troncales de pulpa dental porcina sembradas (4000 células/pocillo) con polvos de jarosita después de 3, 7 y 10 días. Los resultados se expresan como la media y la desviación estándar de la viabilidad celular.	64
Figura 47. Imágenes representativas del depósito mineral en células troncales de pulpa dental porcina el día 21 por ARS, con sus respectivas micrografías: (a) control (células y DMEM); (b) células, JKCa2 y DMEM; (c) células, JKCa2 y kit de diferenciación osteogénica; (d) células, JKAlI y DMEM; (e) células, JKAlI y kit de diferenciación osteogénica.	66
Figura 48. Imágenes representativas del depósito mineral en células troncales de folículo dental humano el día 28 por ARS: (Grupo A) control (células y DMEM); (Grupo B) células, JKCa2 (1.5 mm ³) y DMEM; (Grupo C) células, JKCa2 (1.5 mm ³) y kit de diferenciación osteogénica; (Grupo D) células, JKCa2 (3.0 mm ³) y DMEM; (Grupo E)	

células, JKCa2 (3.0 mm³) y kit de diferenciación osteogénica; (Grupo F) células, JKCa2 (4.5 mm³) y DMEM; (Grupo G) células, JKCa2 (4.5 mm³) y kit de diferenciación osteogénica; (Grupo H) células, JKCa2 (6.0 mm³) y DMEM; (Grupo I) células, JKCa2 (6.0 mm³) y kit de diferenciación osteogénica..... 68

Figura 49. Imágenes representativas del depósito mineral en células troncales de folículo dental humano el día 28 por ARS: (Grupo A) control (células y DMEM); (Grupo B) células, JKAll (1.5 mm³) y DMEM; (Grupo C) células, JKAll (1.5 mm³) y kit de diferenciación osteogénica; (Grupo D) células, JKAll (3.0 mm³) y DMEM; (Grupo E) células, JKAll (3.0 mm³) y kit de diferenciación osteogénica; (Grupo F) células, JKAll (4.5 mm³) y DMEM; (Grupo G) células, JKAll (4.5 mm³) y kit de diferenciación osteogénica; (Grupo H) células, JKAll (6.0 mm³) y DMEM; (Grupo I) células, JKAll (6.0 mm³) y kit de diferenciación osteogénica. 69

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Minerales de miembros finales del grupo jarosita y análogos sintéticos (Cogram, 2018).....	3
Tabla 2. Comparación de Células troncales de folículo dental humano (DFCs) y Células troncales de pulpa dental (DPSC)(Zhou et al., 2019).....	15
Tabla 3. Tamaños de poro recomendados para crecimientos celulares y tejidos (Bao, 2020).	17
Tabla 4. Composición química semi cuantitativa elemental por energía dispersiva de las muestras de jarosita (porcentaje en peso % Wt).....	49
Tabla 5. Tamaños de cristal de JKCa.	57
Tabla 6. Tamaños de cristal JKCa2.....	59
Tabla 7. Tamaños de cristal JKAll.	61

I. INTRODUCCIÓN

Los compuestos tipo jarosita, representados por $MFe_3(SO_4)_2(OH)_6$ donde M puede ser Na, K, Rb, Ag o NH_4 , han tenido una amplia aplicación en procesos metalúrgicos y mineralógicos. A menudo se asocian con drenaje ácido de minas, meteorización de depósitos de mineral de sulfuro, alteraciones hidrotermales, oxidación de piritita o meteorización en suelos ácidos, o incluso en sedimentos salinos naturalmente ácidos en condiciones oxidantes y bajo pH, que puede ocurrir en dos tipos de escenarios; el primer tipo es volcánico, donde los gases que incluyen H_2S y SO_2 se disuelven y oxidan en lagos de caldera o fuentes termales, mientras que el segundo tipo está presente en áreas donde se oxidan minerales de sulfuro de hierro.

La jarosita potásica de fórmula $KFe_3(SO_4)_2(OH)_6$ y cuyo nombre mineral es simplemente jarosita [6], ha sido empleada en el proceso de la industria del zinc para precipitar el hierro no deseado y otros elementos para facilitar la etapa de filtrado. Además, se ha abordado la recuperación de metales valiosos a partir de residuos de jarosita. Sin embargo, algunas investigaciones han mencionado el uso de este tipo de compuestos como ánodos y/o cátodos en baterías de iones de litio, mediante la síntesis de material bidimensional compuesto por $KFe_3(SO_4)_2(OH)_6/rGO$ utilizando láminas de óxido de grafeno. a través de un proceso de oxidación en fase de solución a temperatura elevada. Estudios recientes han demostrado que puede haber intercambio iónico electroquímico en la jarosita, existiendo fases mixtas estructuralmente estables. Por lo tanto, dopar este material con algunos elementos como el sulfato de calcio, que tiene una larga historia de aplicación clínica debido a sus propiedades y buena compatibilidad, podría ser una estrategia prometedora para superar la escasez de injertos. adecuado para la neoformación de tejido óseo en la regeneración de tejidos.

Todos los estudios relacionados con compuestos tipo jarosita han encontrado interesantes y avanzadas innovaciones, ya sea modificando parámetros y métodos de síntesis, obteniendo morfologías y tamaños de partícula adecuados para evaluar nuevas propiedades que los sitúan como un material con posibles aplicaciones en nuevos campos como el de ingeniería del tejido óseo.

Lo anterior se basa principalmente en tres componentes fundamentales: Células, Andamios (biomateriales) y Biomoléculas, o inductores o factores de crecimiento. Idealmente, la combinación de estos tres elementos crea un producto trasplantable quirúrgicamente que promueve la regeneración del tejido óseo y restaura la función biológica intrínseca del tejido óseo. La mayoría de los biomateriales utilizados como andamios en la creación de una matriz extracelular (MEC) están elaborados con cerámicas de silicato de calcio, fosfato de calcio o cerámicas bioactivas a base de estroncio cuya evidencia indica que promueven una mejor reparación ósea y radiopacidad para obtener imágenes fácilmente. Los campos de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa continúan enfrentando grandes desafíos debido a la dificultad de recrear la complejidad inherente del entorno regenerativo.

Por lo tanto, este trabajo demuestra mejoras en la síntesis de la jarosita de potasio dopada, como baja temperatura de operación (70 °C), dopaje con calcio, tiempo de síntesis corto (3 horas) y cambios en el pH. Así que este método modificado hace que la síntesis de este tipo de compuestos sea económica y respetuosa con el medio ambiente. De esta forma, la adición de otros elementos a la estructura de la jarosita y los cambios propuestos en el pH de síntesis, han contribuido significativamente en la morfología y tamaño final de las partículas de jarosita potásica así obtenidas.

Finalmente, el producto así obtenido podría ser un material novedoso ideal para ser utilizado en ingeniería de tejido óseo, ya que no presenta efectos citotóxicos y muestra buenas propiedades osteoinductoras.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Jarosita

Las jarositas forman una familia de minerales de hidroxisulfato de hierro que comúnmente ocurren como productos secundarios en ambientes ácidos ($\text{pH} < 3.0$) (Amoros et al., 1981), ricos en sulfato formados por la oxidación de minerales de sulfuro, especialmente pirita (FeS_2), y en desechos de procesamiento de minerales (Welch et al., 2008). A menudo se asocian con drenaje ácido de minas, meteorización de depósitos de minerales de sulfuro, alteraciones hidrotermales, oxidación de pirita o meteorización en suelos ácidos (Long et al., 1992). Incluso ocurren en sedimentos salinos naturalmente ácidos en condiciones oxidantes y valores bajos de pH (Battler et al., 2013), que pueden ocurrir en dos tipos de entornos: el primer tipo es el volcánico, donde los gases que incluyen H_2S y SO_2 se disuelven y oxidan en lagos de caldera o aguas termales (Varekamp et al., 2000); mientras que el segundo tipo está presente en áreas donde los minerales de sulfuro de hierro se oxidan (Zolotov y Shock, 2005)(Figura 1). De igual manera, se encuentra a menudo en entornos de drenaje ácido de minas, formados particularmente en desechos mineros de depósitos de mineral de sulfuro polimetálico como resultado de la meteorización en los desechos mineros (procesos de drenaje ácido de mina).



Figura 1. Jarosita localizada en Barranco de Jaroso, Sierra Almagrera, Cuevas del Almanzora, Almería, España (imagen obtenida de <https://mineral-s.com/jarosita>)

Actualmente los minerales de sulfato secundario tienen una connotación ambiental negativa porque concentran una gran cantidad de elementos tóxicos, particularmente los metales peligrosos plomo y talio, los cuales son liberados en los acuíferos y los suelos. A pesar de ello, la jarosita actúa como un eliminador e inmovilizador eficaz de esos metales, principalmente el plomo (Figueiredo & da Silva, 2011). De igual manera, ha sido identificada en la superficie de Marte por el Rover Opportunity (Christensen et al., 2004) donde existen situaciones suficientes para su formación (agua y condiciones ácidas). Así, su estabilidad hace que la jarosita sea potencialmente útil para retener evidencia textural, química e isotópica de la historia pasada, incluida la posible actividad biológica, en Marte (Navrotsky et al, 2005).

1.2. Minerales de la familia jarosita

Los minerales de la familia de la jarosita forman parte del supergrupo isoestructural alunita, que tiene la fórmula química general $AB_3(TO_4)_2(OH)_6$ (Jambor, 1999; Dutrizac y Jambor, 2000; Smith et al., 2006). Donde el sitio A puede contener un total de 16 iones diferentes: K, Na, H₃O, Ag, Pb, NH₄, Cu, Tl, Ca, Ba, Sr, Ce, La, Nd, Bi, y Th (Jambor, 1999; Dutrizac y Jambor, 2000; Basciano, 2008). El sitio T contiene S⁶⁺, As⁵⁺ y/o P⁵⁺, así como Si⁴⁺ en dos minerales de miembros finales (Scott, 1987; Jambor, 1999; Dutrizac y Jambor, 2000). El sitio B contiene Al³⁺ o Fe³⁺, así como Ga³⁺ y V³⁺ en un mineral cada uno (Dutrizac y Jambor, 2000; Basciano, 2008). Los minerales de alunita contienen Al³⁺ ocupando el sitio B, mientras que en los minerales de jarosita contienen Fe³⁺ ocupando el sitio B (Jambor, 1999; Dutrizac y Jambor, 2000).

El grupo jarosita comprende 8 minerales (tabla 1): Jarosita, Natrojarosita, Hidroniojarosita, Argentojarosita, Plumbojarosita, Amoniojarosita, Beaverita y Dorallcharite. Igualmente, se han sintetizado análogos de estos materiales como la jarosita de Mercurio y jarosita de Rubidio, sin embargo, no se conocen ejemplos naturales de estos compuestos (Cogram, 2018).

Tabla 1. *Minerales de miembros finales del grupo jarosita y análogos sintéticos (Cogram, 2018).*

Nombre del mineral	Fórmula	Análogo sintético	Referencias
Jarosita	$\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$	Jarosita de potasio	Jambor (1999),
Natrojarosita	$\text{NaFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$	Jarosita de sodio	Dutrizac and Jambor
Hidroniojarosita	$(\text{H}_3\text{O})\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$	Jarosita de hidronio	(2000), Drouet and
Argentojarosita	$\text{AgFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$	Jarosita de plata	Navrotsky (2003),
Plumbojarosita	$\text{Pb}_{0.5}\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$	Jarosita de plomo	Smith (2004),
Amoniojarosita	$(\text{NH}_4)\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$	Jarosita de amonio	Basciano (2008), and
Beaverita	$\text{Pb}(\text{Fe,Cu})_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$	Plomo Fe-Cu-Jarosita	Hudson-Edwards et
Dorallcharite	$\text{Tl}_{0.8}\text{K}_{0.2}\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$	Jarosita de talio	al. (2008)
Mineral no natural	$\text{Hg}_{0.5}\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$	Jarosita de mercurio	Dutrizac & Kaiman
Mineral no natural	$\text{RbFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$	Jarosita de rubidio	(1976),Jambor(1999)

1.3. La jarosita potásica

La jarosita potásica de fórmula $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ y cuyo nombre mineral es simplemente jarosita (Dutrizac y Kaiman, 1976; Dutrizac y Jambor, 2000), tiene un sistema cristalino hexagonal y la estructura cristalina con simetría trigonal (Figueiredo y Pereira da Silva, 2011). Asimismo, la celda unitaria contiene 3 K, 9 Fe, 6 S, 24 O y 18 (OH) (figura 2), es de apariencia amarillo pardo o rojo óxido (cristalizada) y con morfología de cristales pequeños en forma de costras granulares o en nódulos, pulverulenta a tierra. Ha sido empleada en el proceso de la industria del zinc para precipitar el hierro no deseado y otros elementos como el plomo para facilitar la etapa de filtrado (Jun et al., 2022).

La jarosita potásica de fórmula $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ y cuyo nombre mineral es simplemente jarosita (Dutrizac y Kaiman, 1976; Dutrizac y Jambor, 2000), tiene un sistema cristalino hexagonal y la estructura cristalina con simetría trigonal (Figueiredo y Pereira da Silva, 2011). Asimismo, la celda unitaria contiene 3 K, 9 Fe, 6 S, 24 O y 18 (OH) (figura 2), es de apariencia amarillo pardo o rojo óxido (cristalizada) y con morfología de cristales pequeños en forma de costras granulares o en nódulos, pulverulenta a tierra. Ha sido empleada en el proceso de la industria del zinc para precipitar el hierro no deseado y otros elementos como el plomo para facilitar la etapa de filtrado (Jun et al., 2022).

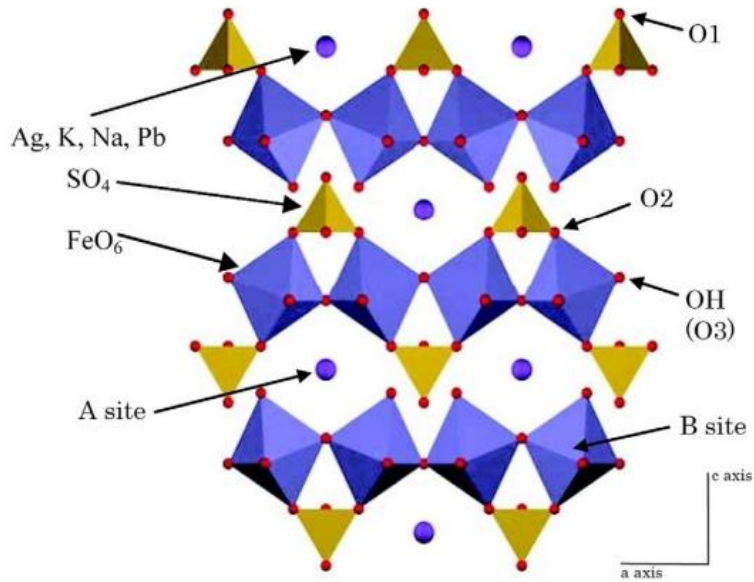


Figura 2. Imagen tomada de *Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Donde se muestra a estructura de jarosita del octaedro de FeO_6 se une a los tetraedros de SO_4 (comparte esquinas con ellos), formando láminas perpendiculares al eje c , con iones del sitio A (p. ej., Ag, K, Na, Pb y H_3O) ubicados entre el tetraedro-octaedro- láminas tetraédricas. (Cogram, 2018).

Se han observado jarositas de potasio sintéticas a través de microscopía electrónica de barrido, teniendo micrografías de su morfología y topografía. En la figura 3 se puede observar que los cristales tienden a aglomerarse formando partículas más grandes y, a menudo, se encuentran de forma aislada. Teniendo tamaños de grano variados de aproximadamente 1 a 5 micras. Su morfología es muy similar a estudios anteriores donde informan que las han sintetizado (Sasaki y Konno, 2000) (Hernández et al, 2021).

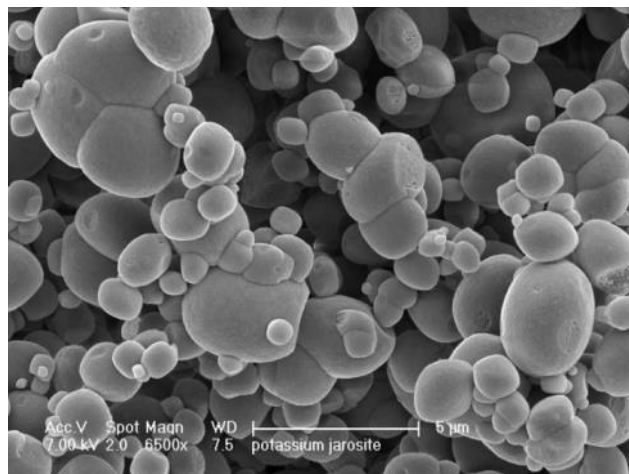


Figura 3. Micrografía de Microscopio Electrónico de Barrido de una jarosita de potasio sintética. (Smith et al, 2006).

1.4. Tejido óseo

El hueso es un compuesto tridimensional con una estructura jerárquica intrincada de fibra de colágeno mineralizada por cristales de hidroxiapatita nanométrica $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})]$ formada por la combinación de la sal mineral de fosfato de calcio $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ e hidróxido de calcio $[\text{Ca}_3(\text{OH})_2]$. Conforme se va formando, se unen también otras sales minerales como el carbonato de calcio $[\text{CaCO}_3]$ e iones de Magnesio, Estroncio, Flúor, potasio y sulfato provocando la calcificación, que es la deposición y endurecimiento de estos cristales en las fibras de colágeno de la matriz extracelular. Este proceso lo inician los osteoblastos, que son las células formadoras del hueso.

El hueso humano es un tejido conectivo denso y duro que consta de componentes orgánicos e inorgánicos con un contenido de agua de aproximadamente 10 a 20 %, de un 60 a 70 % de mineral óseo y el resto se contribuye a las fibras de colágeno (Marks y Popoff, 1988). Los huesos forman el sistema esquelético y tienen la tarea de producir glóbulos rojos y blancos, almacenar minerales y proteger y sostener muchos órganos del cuerpo humano. Además, el hueso se compone de trazas de proteínas y sales inorgánicas (figura 4)(Marks y Popoff, 1988).

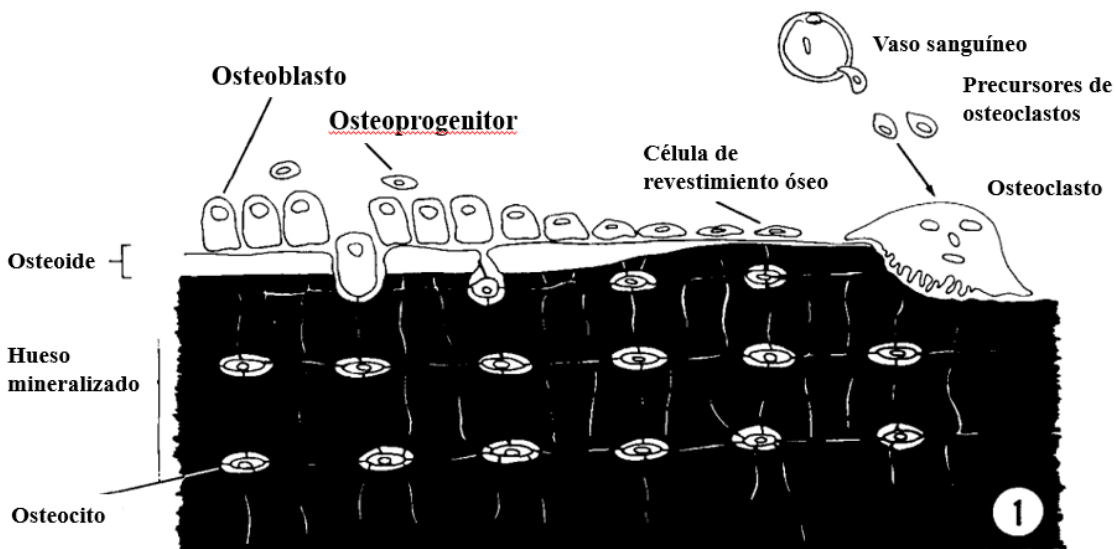


Figura 4. Relaciones topográficas entre las células óseas. (Modificado de un dibujo de T. Chambers) (Marks y Popoff, 1988).

La estructura ósea está optimizada para ser lo más fuerte posible y lo más ligera posible, en términos relativos. El centro del hueso consiste en médula ósea y está rodeado por dos tipos de hueso, el hueso esponjoso (trabecular) y el hueso compacto (cortical). El hueso cortical se compone principalmente de osteonas que forman formas cilíndricas y contribuyen a la resistencia del hueso a la flexión. Dentro de las osteonas se encuentra una red de osteocitos que son cruciales para mantener la integridad estructural del hueso. Los vasos sanguíneos del hueso cortical que facilitan los intercambios entre los osteocitos y la sangre se encuentran en el centro de las osteonas, junto con los nervios que recorren el hueso. Estos vasos y nervios se encuentran dentro de una estructura llamada canales haversianos. La función principal del hueso trabecular es resistir la compresión donde los osteocitos juegan un papel importante al detectar una mayor tensión en el hueso (figura 5).

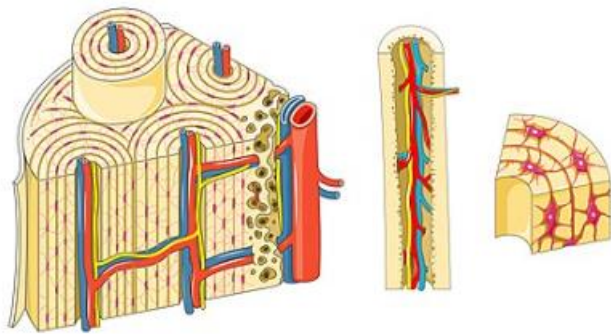


Figura 5. Representación de Osteona. Imagen tomada de <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=82640872>.

El tejido óseo se encuentra compuesto por 4 tipos de células (células osteogénicas, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos)(figura 6) (Weiner y Wagner, 1998; Florencio et al., 2015).

- a) Osteoblastos. Los osteoblastos son células cuboidales formadoras de hueso, se encuentran a lo largo de la superficie ósea y comprenden del 4 al 6% del total de las células óseas. Estas células tienen abundante retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi prominente, así como varias vesículas secretoras. Al final de un ciclo de formación ósea, los osteoblastos quedan rodeados por la matriz osteoide, convirtiéndose en osteocitos incorporados a la matriz ósea.

- b) Osteocitos. Los osteocitos son células óseas maduras de forma dendrítica, con una vida útil de hasta 25 años. Comprenden el 90-95% de las células óseas totales siendo las más abundantes. Desempeñan diversas funciones importantes en el hueso, manteniendo el metabolismo del tejido óseo mediante el intercambio de nutrientes y productos con la sangre. Estas células son de menos tamaño que los osteoblastos por lo que el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi disminuye. Los osteocitos están ubicados dentro de lagunas rodeadas de matriz ósea mineralizada.
- c) Osteoclastos. Los osteoclastos son células de gran tamaño multinucleadas que se originan a partir de células mononucleares hematológicas. Se localizan en la cara próxima a la superficie ósea (endostio) teniendo un borde dentado donde libera enzimas y ácidos que digieren los componentes minerales de la matriz osteoide. Los osteoclastos no sólo son células de reabsorción ósea, también influyen en la actividad de otras células controlando el ciclo de remodelación ósea.

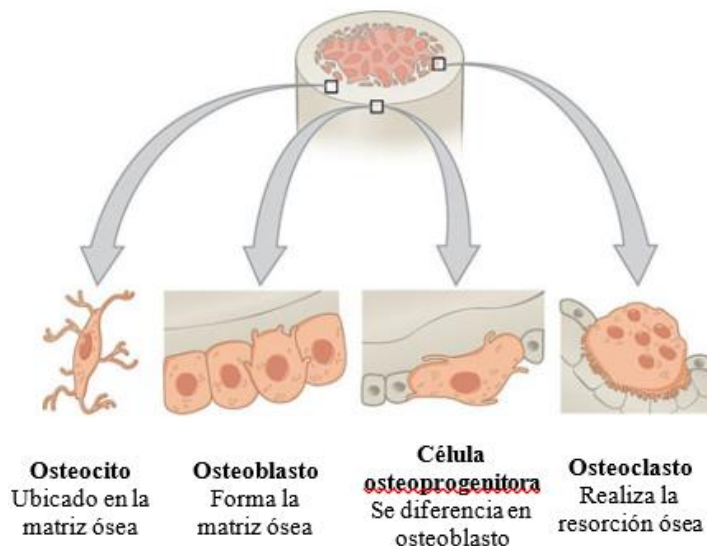


Figura 6. Células óseas. Imagen tomada de <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=30131411>.

El hueso constituye el 18% del hueso corporal y proporciona soporte esquelético y metabolismo indispensable para nuestro cuerpo (Zhong y Shibata, 2022). El tejido óseo es el segundo tejido más trasplantado después de la sangre con más de 2.5 millones de

procedimientos de injerto óseo realizados anualmente en todo el mundo (Wang y Yeung, 2017).

A pesar de la capacidad de regeneración intrínseca que tiene el hueso y con su rara capacidad de cicatrizar sin formar cicatriz fibrótica, sigue teniendo un porcentaje de 5 – 20 % de pacientes con fracturas de huesos largos que sufren retraso en la reparación o una falta de unión (Lackington y Thompson, 2020). Asimismo, se sabe que la edad influye en el proceso de curación de los defectos óseos, siendo las personas mayores quienes se curan más lentamente sufriendo complicaciones (Cheng et al., 2019). Por otro lado, teniendo en cuenta que la remodelación ósea es gracias a la acción conjunta de los osteoblastos y osteoclastos, algunas fracturas o enfermedades provocan defectos irreparables. En fracturas de huesos largos, regularmente se colocan placas o tornillos con relleno en andamios (figura 7) (Cognet et al 2009).

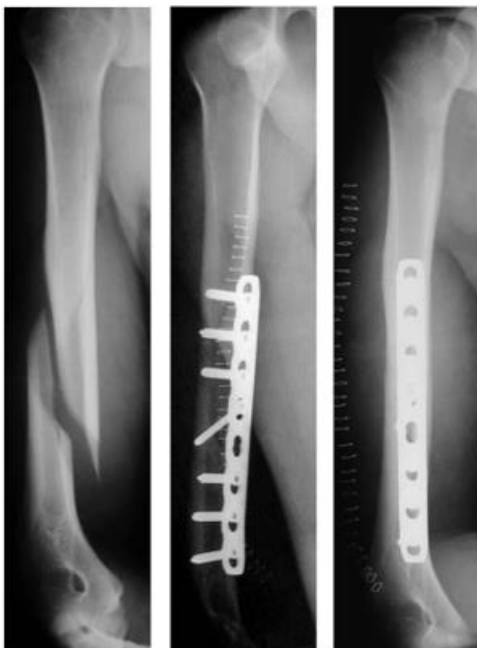


Figura 7. Ejemplo de presencia de placas y tornillos para conseguir una estabilidad absoluta en una fractura de hueso largo, sin movilidad alguna para iniciar una rehabilitación adecuada. Imagen modificada de (Cognet et al, 2009).

Sin embargo, diversos materiales sintéticos han tratado de imitar su matriz orgánica rígida calcificada para formar hueso nuevo mayor a 5 mm, cuando hay pérdida de hueso por cualquier etiología el cuerpo *per se* no logra formar suficiente hueso nuevo, no obstante, estas sustituciones tienen desventajas específicas en biocompatibilidad, degradabilidad,

capacidad osteogénica y respuestas histoquímicas por parte del tejido huésped (Chen et al, 2011). La ingeniería de tejidos ósea se encarga de realizar materiales que ayuden al proceso de regeneración, siendo algunos materiales más comunes los cementos de fosfato de calcio, mezclas de fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico.

1.5. Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es una línea de investigación dentro del campo de la medicina regenerativa. En 1993 R Langer y JP Vacanti definen la ingeniería tisular como “un campo multidisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida con el objetivo de desarrollar sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función de los tejidos a través del desarrollo de estructuras biológicas”. Esta disciplina combina una serie de elementos como células diferenciadas o células troncales mesenquimales (MSC), estimulando la creación de materiales inertes y bioactivos (andamios) cuyas características permitan la construcción de la base que tolere la formación de tejido específico (Curbelo et al, 2020) a partir de biomoléculas o inductores de factores de crecimiento (Rosales et al., 2012) (Figura 8).

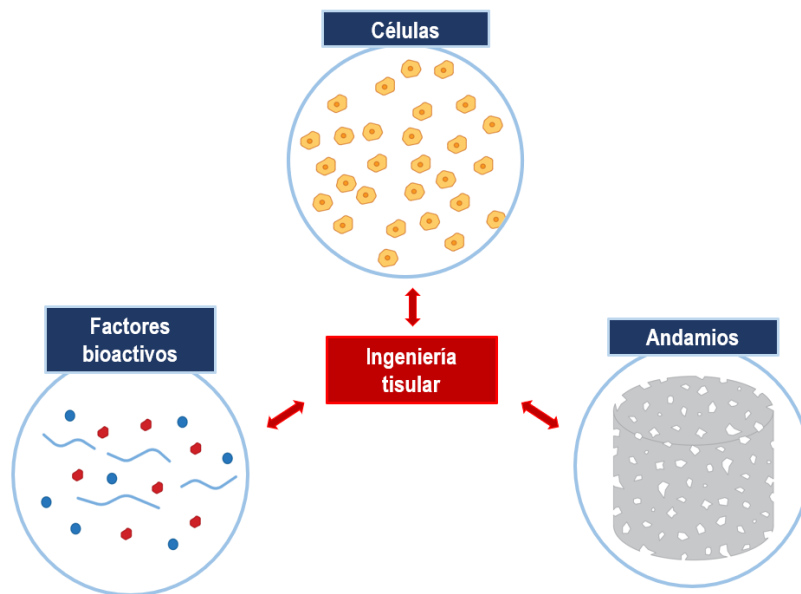


Figura 8. Tríada de ingeniería de tejidos. Los andamios, las células y los factores bioactivos se utilizan de forma aislada o en combinación para imitar el tejido deseado.

Los materiales que puedan reemplazar el tejido óseo deben de tener ciertas especificaciones precisas , como ser biocompatible, biorreabsorbible, osteoconductor, osteoinductivo, morfológicamente similar al hueso, fácil de usar, etc. (Fernández et al, 2018)

Diversas estrategias para diseñar andamios que combinen materiales bioactivos, células y factores de crecimiento han sido investigados ampliamente para restaurar tejidos y órganos dañados. La mayoría de los materiales que se comercializan principalmente son osteoconductores, siendo muy pocos los que ofrecen propiedades osteoinductivas. Se requieren de estrategias que permitan otorgar células para promover la regeneración de tejidos mientras se brinda soporte físico temporal, cuya finalidad sea superar las limitaciones de los tratamientos convencionales basados en trasplantes de órganos (Langer & Vacanti, 1993; Shimojo et al, 2020). Idealmente, la combinación de estos tres elementos crea un producto trasplantable quirúrgicamente (andamio) que promueve la regeneración del tejido óseo y restaura la función biológica intrínseca del tejido óseo (Lu et al., 2014).

En la ingeniería de tejidos es fundamental tener controlado el microambiente extracelular para dirigir la capacidad de las células a organizarse, crecer, diferenciarse y crear una matriz extracelular y el nuevo tejido funcional (Morales 2014). Todo esto es un proceso bastante complejo para tener una buena interacción célula-matriz y célula-célula para la formación del tejido 3D (Scheller et al., 2009). Sin embargo, la falta de un control espacial perfecto o completo sobre la distribución de células, poros y señales biológicas y mecánicas limita la capacidad en la creación de procesos regenerativos.

1.5.1. Células troncales mesenquimales

Las células troncales, también llamadas células madre, células estromales, célula tronco y Stems Cells (SC, por sus siglas en inglés) son células capaces de replicarse durante varios periodos de tiempo mediante mitosis y que tienen la capacidad única de diferenciarse en distintos tipos de células especializadas (Botes W.M., 2016). Según la definición convencional, pueden renovarse indefinidamente a través de la “auto-renovación” (Slack , 2008), siendo de gran importancia para regenerar tejidos faltantes y tratar enfermedades. Se pueden clasificar por su origen en embrionarias (Liang G., 2012), adultas (Egusa, 2012), iPSCs (Yamanaka, 2006); y por su plasticidad en Totipotentes (Kolios, 2013), pluripotentes

(Wobus, 2005), Multipotentes (Krampera, 2007), Oligopotentes (Banerjee, 2014) y Unipotentes (Singh, 2016).

En odontología se han identificado células troncales mesenquimales /estromales (MSC por sus siglas en inglés *Mesenchymal Stem Cells*) la cuales son células progenitoras pluripotentes que se dividen muchas veces y cuya descendencia eventualmente da lugar a tejidos esqueléticos: cartílago, hueso, tendón, ligamento, estroma de la médula, tejido conectivo (Caplan A., 1991). Se originan en la capa embrionaria mesodermo donde da origen a los elementos esqueléticos del cuerpo (figura 9). El término mesénquima deriva de meso que significa “medio” y del griego enkhyma “infusión” teniendo la capacidad para propagarse y migrar en el desarrollo embrionario temprano entre las capas ectodérmica y endodérmica. Las 3 capas embrionarias diferenciadas aparecen en la etapa de gastrulación, la cual sucede a partir de las semanas 4 y 5 de embarazo, donde el embrión pasa a llamarse disco embrionario trilaminar. Este proceso es posiblemente la etapa más importante del desarrollo embrionario, ya que a partir de las tres capas se generarán todos los tejidos y órganos del cuerpo.

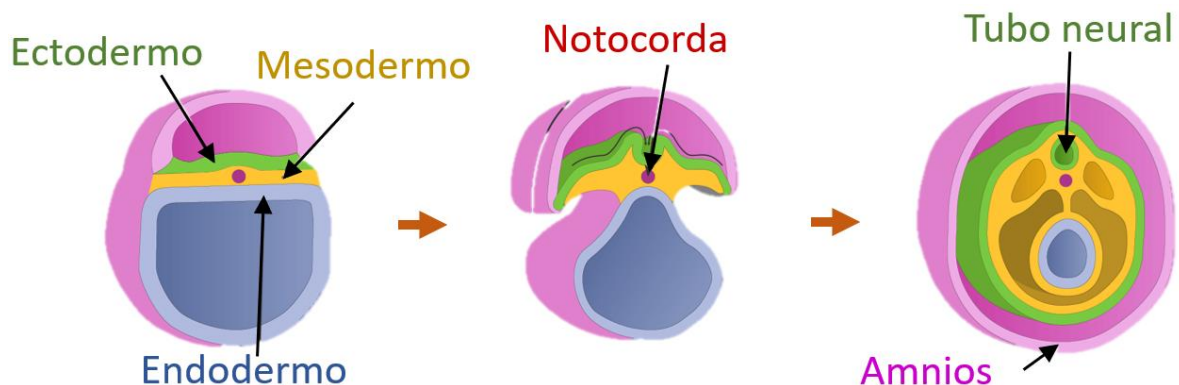


Figura 9. Inicio de la organogénesis en el embrión (Gastrulación) (Imagen tomada de <https://www.reproduccionasistida.org/quinta-semana-de-embarazo/>).

La capacidad que tienen las células mesenquimales de ser multipotentes y el poder diferenciarse en varios tipos de células, es clave para la reparación de heridas en organismos adultos que involucran células mesenquimales en la piel (dermis), hueso (periostio) o músculo (perimisisio) (Caplan, 1991). La actividad migratoria de las células mesenquimales se complementa con su capacidad de formar blastemas de reparación, que

luego son capaces de responder a señales locales y diferenciarse en consecuencia para lograr una reparación regenerativa (Caplan, 1988).

Una fuente propicia de MSC es el tejido bucal, el cual es fácilmente accesible y donde pueden aislarse las células troncales de dientes deciduos exfoliados humanos (SHED, por sus siglas en inglés *stem cells isolated from human exfoliated deciduous teeth*), las células troncales de la pulpa dental (DPSC, por sus siglas en inglés *Dental Pulp Stem Cells*), células troncales del folículo dental (DFSC, por sus siglas en inglés *Dental Follicle Stem Cells*) y células troncales del ligamento periodontal (PDLSCs, por sus siglas en inglés *Periodontal Ligament Stem Cells*). Todas estas fuentes de células troncales tienen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condrocitos en condiciones adecuadas (Yildirim et al., 2016).

1.5.1.1. Células troncales de pulpa dental porcina

En comparación con otras fuentes de tejido adulto, las células troncales de la pulpa dental (CMPD) son un tipo de células troncales dentales adultas de fácil acceso. Además, son capaces de diferenciarse en al menos tres linajes celulares distintos: osteo/odontogénico, adipogénico y neurogénico. También, estudios han revelado que las CMPD pueden expresar varios factores de crecimiento angiogénicos, lo que indica que puede inducir la angiogénesis (Aksel y Huang, 2017).

El modelo porcino es el más cercano en cuanto a morfología ósea, con una estructura ósea en capas similar a la humana con densidad y contenido mineral óseos casi iguales. También, tienen un metabolismo similar ya que la tasa de crecimiento óseo es comparable a la humana (Lu et al., 2020). Así mismo existe una gran similitud entre los minipigs (cerdos miniatura) y los humanos en términos de histología y funciones de los tejidos orofaciales (Hu et al., 2016). Por lo tanto, los cerdos se consideran modelos adecuados para estudios relacionados con los huesos (Thorwarth et al., 2005). Sin embargo, en muchas ocasiones se utilizan modelos de animales pequeños debido al manejo diario más sencillo y asequible de estos. Pese a lo cual, existen problemas para reparar y mantener andamios grandes a diferencia de los pequeños. Además, los animales pequeños tienen una gran capacidad de curación ósea, que es diferente a la reparación ósea real del cuerpo humano.

Debido a esto, en este estudio se utilizaron células troncales de pulpa dental porcina (SDPSC, por sus siglas en inglés *Swine Dental Pulp Stem Cells*) para evaluar la citotoxicidad y viabilidad de las muestras de jarositas de potasio dopadas (figura 10), cuya funcionalización se ve reflejada en estudios anteriores donde diversos ensayos determinan tanto la viabilidad como la osteoinducción (Kodonas et al., 2017) (Hu et al., 2016).

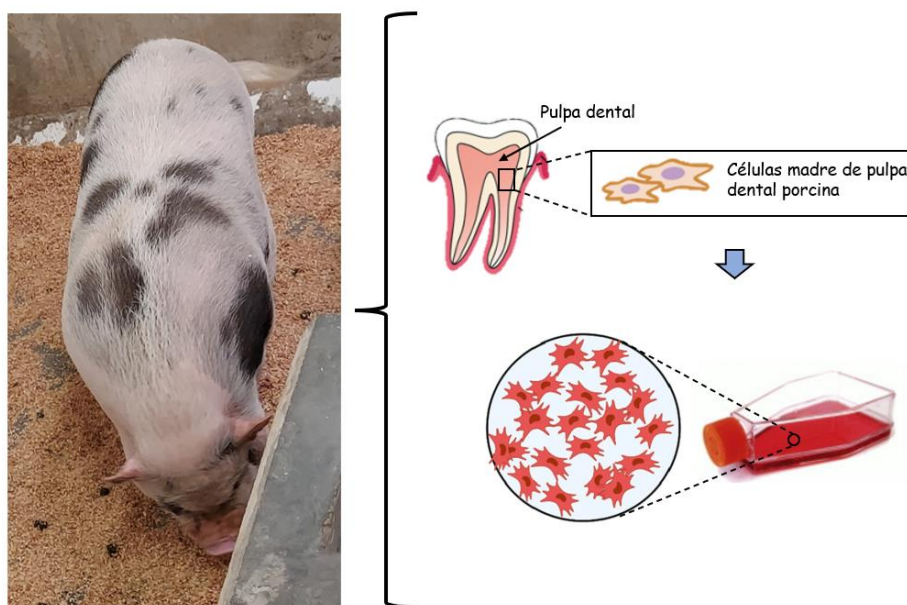


Figura 10. Obtención de células troncales de pulpa dental porcina.

1.5.1.2. Células troncales de folículo dental. (CTFD)

Por otro lado, las células del folículo dental (CMFD) son un grupo de células progenitoras mesenquimales, a veces llamado “saco dental”, que forma un tejido similar a un saco alrededor de los otros dos tejidos germinales del diente (Figura 11). Son las responsables del cemento, el ligamento periodontal y la formación de hueso alveolar en el desarrollo del diente. Participando en la morfología de la corona del diente e involucrándose en los procesos de la formación de la raíz del diente. Así como, son precursores de todas las células mineralizantes y no mineralizantes del periodonto. También son capaces de diferenciarse en osteoblastos para formar nódulos de matriz mineralizada con un estímulo osteogénico apropiado como la dexametasona, la cual, es un glucocorticoide sintético que induce la diferenciación osteoblástica de las células. Estudios demuestran que la presencia

de dexametasona inhibe la proliferación celular, guiando las células hacia el estado de diferenciación o maduración (Porter et al., 2003).

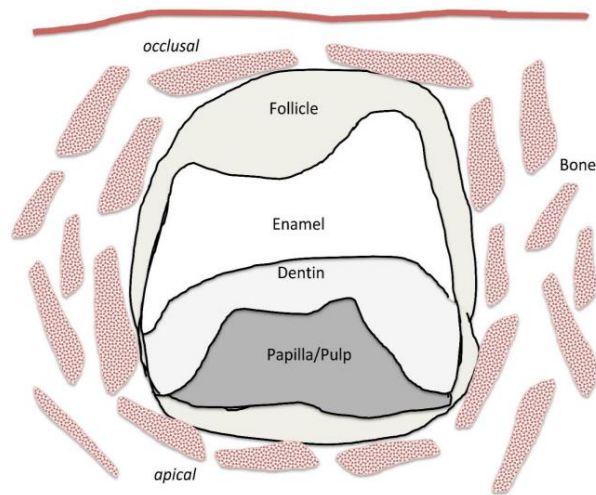


Figura 11. Germen dental completo con folículo dental, papila/pulpa dental y tejido dental mineralizado ya desarrollado (esmalte, dentina) antes de la erupción dental y el desarrollo de la raíz dental (Morsczeck, 2022).

Este tipo de células son capaces de diferenciarse en osteoblastos/cementoblastos, adipocitos, condrocitos y células similares a neuronas (Yao et al 2008). Tiene excelentes propiedades que facilita la aplicación clínica, como en la ingeniería del tejido óseo, la regeneración de la raíz del diente y la regeneración del periodonto. En comparación con otras células troncales, derivadas de la dentición, como las células troncales de pulpa dental (CMPD), las CMFD exhiben una notable capacidad proliferativa, una pluripotencia superior y un alto efecto inmunosupresor que favorece a la ingeniería tisular (Zhou et al., 2019). La siguiente tabla nos muestra las diferencias entre las CMFD y las CMPD (tabla 2).

Tabla 2. Comparación de Células troncales de folículo dental humano (DFCs) y Células troncales de pulpa dental (DPSC) (Zhou et al., 2019).

Tipo de Células	Capacidad de proliferación	Marcadores de superficie celular		Diferenciación multipotente in vivo / in vitro	Propiedades inmunomoduladoras	Aplicación clínica potencial	Referencias
		Positivos	Negativos				
DFCs	++++	CD9		Hueso alveolar, PDL, cemento, adipocitos, osteoblastos, cementoblastos/condrocitos, cardiomiocitos de células similares a neuronas y tejidos similares a dentina	propiedades inmunosupresoras que expresan TLR2, TLR3, y TLR4; aumento de IL-10, IL-6, TGF- β , y IDO-1; disminución de IFN- γ , IL-4, y IL-8; proliferación suprimida de PBMCs; disminución del número de células CD4+ T y aumento de las células reguladoras T	Defectos óseos, regeneración de la raíz del diente, regeneración del tejido periodontal y regeneración del tejido neural	(Lima et al., 2017) (Yildirim et al., 2016)
		CD10					
		CD13					
		CD29					
		CD44					
		CD53					
		CD56					
		CD59					
		CD73					
		CD90					
		CD105					
		CD106	CD31				
		CD146	CD34				
		CD166	CD45				
		CD271	CD133				
		STRO-1					
		NOTCH-1					
HLA-ABC,							
NANOG							
SOX2							
OCT4,							
nestin,							
and beta-III-tubulin							

DPSCs	+++	CD9					
		CD10					
		CD13					
		CD29					
		CD44					
		CD59					
		CD73					
		CD90	CD14	Adipocito, pulpa dentinaria, músculo			
		CD105	CD19	óseo/odontoblasto, mioblasto,			
		CD146	CD24	adipocito,			
		CD106	CD117	osteoblasto, célula similar a neurona,			
		CD146	CD34	cardiomiocito y célula similar a hepatocito			
		CD166	CD45				
		CD271	CD31				
		STRO-1, TRA1-60, y NANOG	CD133				
		SOX2					
Oct-4							
TRA-1-80-1							

1.5.2. Biomateriales (andamios)

Biomaterial es una sustancia o grupo de sustancias utilizadas para sustituir algún tejido, órgano, sin causar efectos adversos. Es la capacidad de tener una respuesta adecuada del huésped ante citotoxicidad, mutagénesis, carcinogénesis, inmunogenicidad y genotoxicidad (Kazimierczak y Przekora, 2020). La mayoría de los biomateriales utilizados como andamios en la creación de una matriz extracelular (MEC) están elaborados principalmente con polímeros como la policaprolactona (PCL) (Cao et al., 2017), ácido poliláctico – poliglicol (PLGA) (Wang et al, 2019) en combinación con colágeno o cerámicas de silicato de calcio (Ramaswamy et al., 2008), fosfato de calcio (Haimi et al., 2009) o cerámicas bioactivas a base de estroncio (Mohan et al., 2013), cuya evidencia indica que favorecen la mejora ósea reparación y radiopacidad para obtener imágenes fácilmente. Los campos de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa continúan enfrentando grandes desafíos debido a la dificultad de recrear la complejidad inherente del entorno regenerativo (Azevedo y Mata, 2022).

Generalmente los tejidos humanos son porosos, con la finalidad de facilitar el crecimiento celular para hacerles llegar nutrientes/oxígeno, eliminar los desechos y la funcionalización

celular (Bao, 2020). La arquitectura de los andamios, así como el tamaño de poro deben ser parecidos al tejido jerárquico. Además, se ha demostrado que la regeneración de tejidos depende principalmente de las estructuras porosas de los andamios como se puede observar en la tabla 3.

Tabla 3. Tamaños de poro recomendados para crecimientos celulares y tejidos (Bao, 2020).

Tamaño de poro	Crecimiento interno
5-15 μm	fibroblastos
$\sim 20 \mu\text{m}$	Hepatocitos
45 – 150 μm	Tejido hepático
20 – 120 μm	Cicatrización efectiva de heridas
100 – 300 μm	Vejiga lisa y células musculares
$>90 \mu\text{m}$	Vascularización

Se han abordado diversas técnicas para intentar lograr replicar las condiciones óptimas de la matriz extracelular, con tamaños de poro deseables con base en las características y resultados requeridos. Algunas de estas técnicas para fabricar construcciones porosas en 3D son la lixiviación con sal, la formación de gas, la separación de fases, el electrohilado y la liofilización. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas no permiten un control preciso de la arquitectura interna del andamio o fabricación de arquitecturas complejas. Además, los andamios fabricados con estas técnicas tienen módulos de compresión de un máximo de 0,4 MPa, que es mucho más bajo que el tejido duro. (10-1500 MPa) o la mayoría de los tejidos blandos (0,4-350 MPa) (Loh y Choong, 2013).

Los materiales utilizados para su elaboración tienen una amplia categorización: metales (Titanio), polímeros (criogel, sistema hidrogel, ácido poliglicoico, ácido poliláctico), cerámicas (sulfato de calcio, fosfato de calcio, vidrios bioactivos) y compuestos (hidroxiapatita). La mayoría de los andamios prefabricados se utilizan solo como un

soporte temporal para el tejido dañado por lo que la degradación debe ser proporcional a la regeneración del tejido. Resultando no ser tóxicos y que el cuerpo los metabolice sin provocar una respuesta inmunitaria (Bao, 2020). Cada tipo de tejido tiene su propio conjunto de características y propiedades cuyas ventajas y desventajas los hacen adecuados para cierto tipo de aplicación. A continuación, abordaremos la ingeniería tisular ósea. Los biomateriales utilizados en la ingeniería de tejido óseo y la medicina regenerativa, suelen clasificarse en poliméricos, cerámicos, metálicos y compuestos (Xie et al., 2020) (Figura 12). Los biomateriales metálicos más utilizados son el titanio (Ti) y sus aleaciones, el acero inoxidable, cobalto, magnesio (Mg). Siendo utilizados como implantes óseos debido a su resistencia a la corrosión, resistencia a la fatiga, durabilidad, tenacidad y biocompatibilidad. Así, los biomateriales metálicos constituyen el 95% de los implantes ortopédicos (Yadav et al., 2020). Sin embargo, los materiales metálicos también tienen algunas limitaciones, como la posible liberación de iones metálicos tóxicos y residuos de desgaste que se producen durante la fricción durante mucho tiempo, lo que provoca respuestas agudas o crónicas después de la implantación. Es importante mencionar que los andamios deben ser biodegradables para proporcionar espacio al tejido óseo recién formado, además de no ser tóxicos.

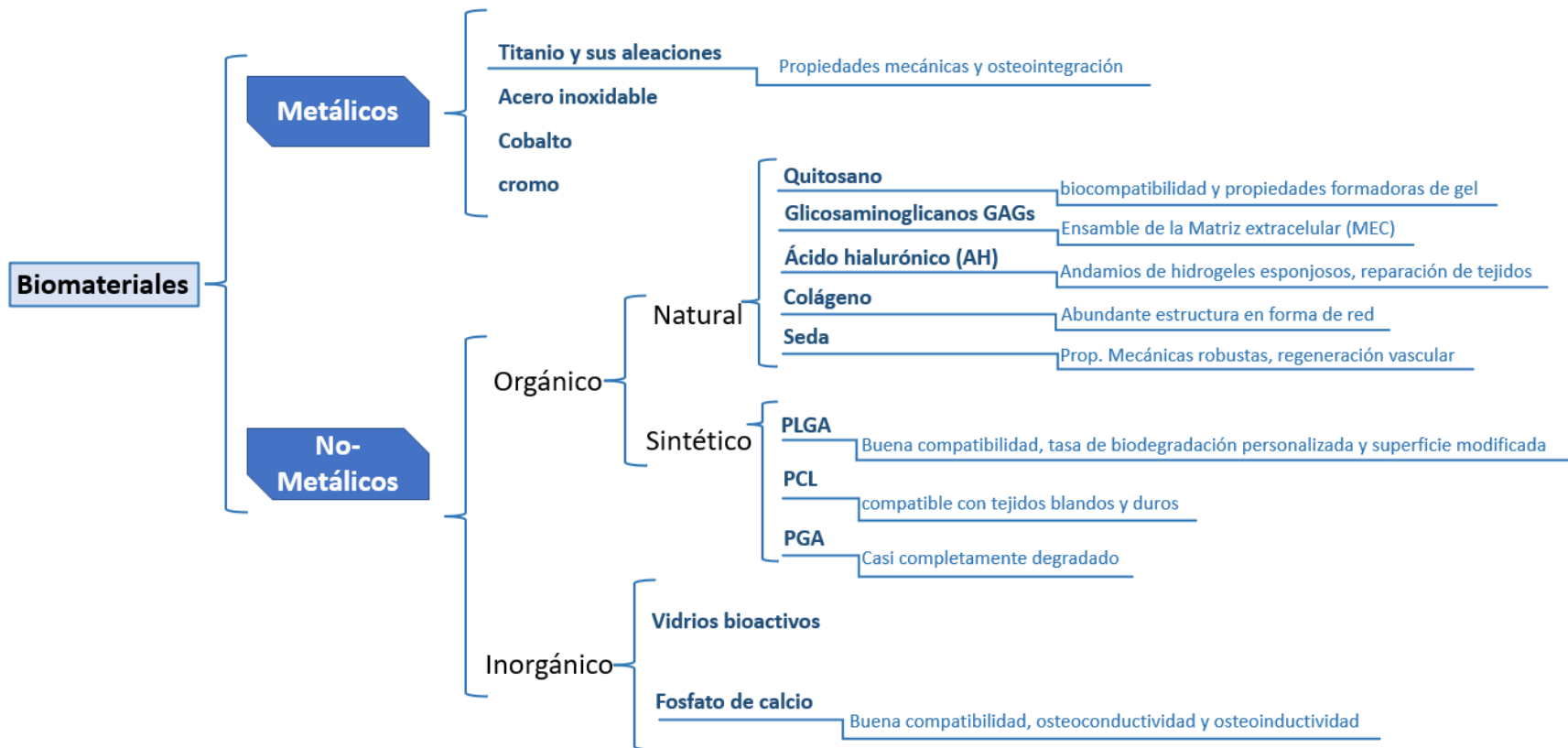


Figura 12. Biomateriales que se aplican principalmente en ingeniería de tejidos y sus características (Xie et al., 2020).

1.5.3. Osteoinducción

La osteoinducción es el proceso que induce la osteogénesis durante la curación del hueso, es decir, formando hueso nuevo a partir de células osteocompetentes en el tejido conjuntivo (Di silvio y Jayakumar, 2009). Las células troncales inmaduras y pluripotentes son estimuladas para convertirse en células preosteoblásticas. Urist identificó la osteoinducción como “el mecanismo de diferenciación celular hacia el tejido óseo debido al efecto fisicoquímico o al contacto con otro tejido” (Urist et al., 1967). La osteoinducción es la principal fuerza impulsora en cualquier situación de consolidación ósea.

Por otro lado, la osteoconducción es ese atributo de un material que permite que crezca hueso nuevo en la superficie. Por lo tanto, cualquier superficie que permita el crecimiento óseo, ya sea por encima o por dentro, es una superficie osteoconductor. En 1987, Wilson-Hench sugirió que el proceso en el que el hueso se alinea con la superficie o el contorno de un material se considera osteoconducción. Esta propiedad es indispensable para el éxito de los implantes óseos. Pocos metales como el Ag, el Cu y el cemento óseo muestran poca o insignificante osteoconducción debido a su escasa biocompatibilidad (Hench, 1987).

La osteointegración se puede realizar como la aposición o interfaz del hueso de conexión y el implante. Se explica como “la unión directa de un implante mediante la formación de tejido óseo alrededor del implante” (diccionario médico ilustrado de Dorland). Se puede realizar como el "puente estructural y funcional directo entre un implante y el hueso" a medida que la deposición ósea aumenta temporalmente.

Los materiales osteoinductores son aquellos que tienen la capacidad de desencadenar la diferenciación de células troncales mesenquimales a linaje osteogénico. Los materiales osteoinductores incluyen autoinjertos, matriz ósea desmineralizada (DBM) y proteínas morfogenéticas óseas específicas (BMP) que forman hueso de forma natural dentro del esqueleto y extraesquelético. Para tener una respuesta celular adecuada con la ayuda de factores bioactivos para permitir la regeneración ósea.

La osteoconductividad, que refleja la capacidad del biomaterial para estimular la adhesión celular. Proliferación y formación de la matriz extracelular ósea (MEO) por los osteoblastos. Los materiales osteoinductores quienes tienen la capacidad para inducir la

diferenciación osteogénica a las células troncales mesenquimales hacia osteoblastos (Kazimierczak y Przekora, 2020). También, otra característica sería su bioactividad que es la capacidad para formar cristales de apatita similares al hueso en sus superficies. Con la finalidad de tener una buena osteointegración del implante para formar una conexión directa con el tejido óseo del huésped.

1.6. Citotoxicidad

La toxicidad es un parámetro que implica el conocer el efecto en el ambiente biológico frente a la introducción o contacto con cualquier agente externo. Este parámetro depende tanto de la dosis, tiempo de exposición, vía de administración, características fisicoquímicas del agente, así como las características del individuo (Kent, 1998). La citotoxicidad se puede definir como la capacidad de una sustancia o proceso que resulta en daño o muerte celular (Eldridge, 2020). Las investigaciones sobre citotoxicidad iniciaron como un esfuerzo por comprender porque existía un rechazo al injerto. Alrededor de los años 50's se realizaron las primeras investigaciones las cuales no mostraron indicios de citotoxicidad posiblemente a que se realizaron en tejidos separados de donantes en lugar de células aisladas. Fue hasta la década de los años 60's que se había demostrado cualitativamente que las células sensibilizadas del sistema inmune podían lisar a células diana (también llamadas células blanco o target en inglés) in vitro. Estudios posteriores demostraron que las células T producían un efecto citotóxico y no necesariamente estas mataban a las células, sino que la inducían en las células diana bajo su propia maquinaria por medio de señalización (Golstein y Griffiths, 2018).

Los biomateriales implantables deben ser principalmente no tóxicos para las células. El procedimiento descrito en ISO10993-5:2009 (Evaluación biológica de dispositivos médicos - Parte 5: Pruebas de citotoxicidad in vitro) recomienda algunos métodos para las pruebas de citotoxicidad in vitro de biomateriales.

1.7. Proliferación celular

La proliferación celular se define como el proceso que conduce al aumento en el número de células debido al equilibrio entre el crecimiento y la división celular con respecto a la pérdida celular. La tasa de proliferación celular varía de una célula a otra dependiendo de su origen y etapa de la célula, la presencia adicional de varios factores de crecimiento, agentes farmacológicos, contaminantes, etc. también influyen en la tasa de proliferación celular (Yadav et al, 2014). Así mismo, juega un papel importante en la homeostasis tisular y celular regular para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento adecuados del organismo. Además, la proliferación celular anormal está asociada con el cáncer, diferentes enfermedades distróficas y autoinmunes (Figura 13).

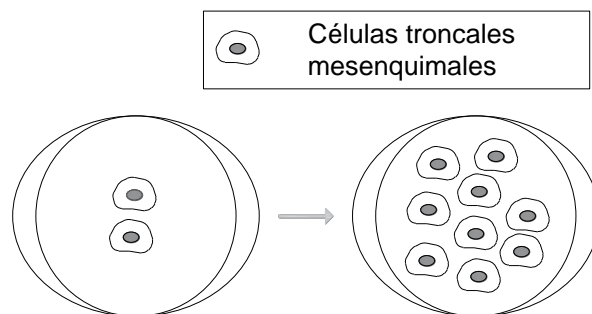


Figura 13. Ejemplo de ensayo de proliferación celular.

Dependiendo de diversos factores, los ensayos de proliferación celular se pueden clasificar en cuatro clases principales: (1) tasa de síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN), (2) actividad metabólica de las células, (3) antígenos asociados con la proliferación celular y (4) variaciones en la concentración de trifosfato de adenosina (ATP). Este artículo, se centrará principalmente en el ensayo de proliferación celular in vitro basado en la actividad metabólica. Este tipo de ensayos miden los niveles de metabolitos importantes como ATP, los cuales aumentan durante la proliferación celular; o utilizan el potencial de reducción de las células para sales de tetrazolio reduciéndose a un producto de formazán a través de deshidrogenasas o reductasas celulares que se detectan por cambio colorimétrico. Así mismo, el colorante de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido) es un colorante redox azul, que es débilmente fluorescente, permeable a las células y sensible a la oxidación (Bueno et al, 2002), se reduce a resazurina y produce cambios tanto fluorescentes

como colorimétricos. La absorción de los medios que contienen la solución de colorante se puede leer utilizando un espectrofotómetro o un lector de microplacas.

Las diferentes sales de tetrazolio comúnmente utilizadas para acceder a la actividad metabólica de las células, se pueden clasificar según su modo de acción en dos grupos: Compuestos con carga positiva que penetran fácilmente en células eucariotas viables como el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), y otros con carga negativa y no penetran fácilmente las células como el 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) y sales de tetrazolio solubles en agua (WST).

1.8. Ensayo MTT

El ensayo utilizado en este trabajo es el MTT, el cual fue descrito por primera vez por Mosmann en 1983, siendo un ensayo desarrollado como alternativa no radioactiva a la incorporación de ³H-timidina en el ADN para medir la proliferación celular, utilizándose tanto para monocapa como para células suspendidas (Henriksson et al., 2006). El ensayo MTT se basa en la capacidad de las enzimas deshidrogenasa mitocondrial celular, en células vivas para reducir el sustrato amarillo soluble en agua MTT en un producto de formazán azul oscuro/púrpura, que es insoluble en agua o en medios de cultivo (Yadav et al, 2014) (figura 14). Estos cristales de formazán, producidos durante la reducción, deben disolverse utilizando isopropanol acidificado, DMSO, dimetilformamida, dodecilsulfato de sodio (SDS) y combinaciones de detergente y disolvente orgánico (Marshall et al., 1995). La acidificación de la solución solubilizante tiene la ventaja de cambiar el color del rojo de fenol a amarillo, lo que puede tener menos interferencia con las lecturas de absorbancia. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células en un rango de líneas celulares (Mosmann, 1983), lo cual se mide registrando los cambios en la absorbancia a 570 nm utilizando un espectrofotómetro de lectura de placas.

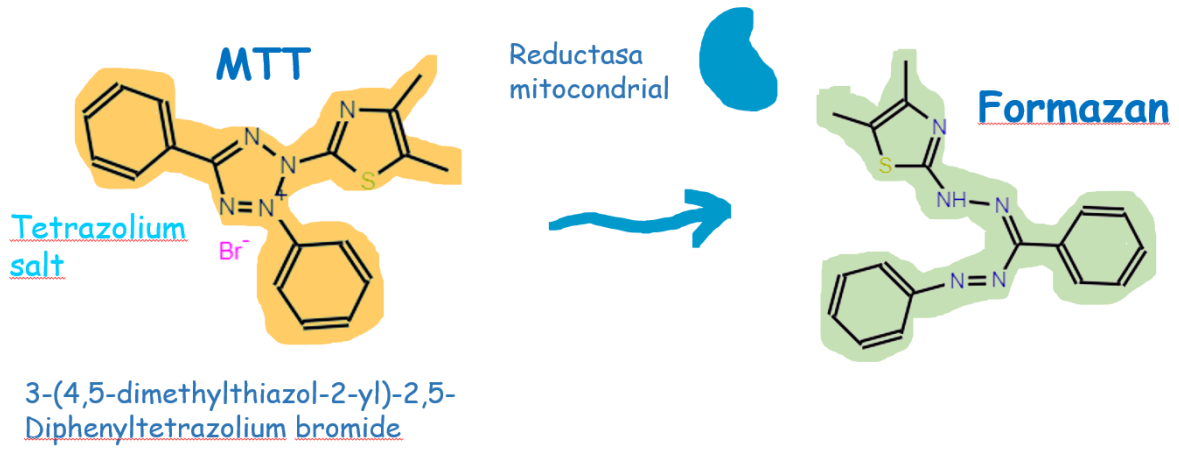


Figura 14. Ensayo MTT para determinar viabilidad celular.

2. ANTECEDENTES

2.1. Jarositas

Los compuestos de tipo jarosita, representados por $MFe_3(SO_4)_2(OH)_6$ donde M puede ser Na, K, Rb, Ag, Tl(I), H₃O, NH₄, ½Pb(II) o ½Hg(II), han tenido una amplia aplicación en procesos metalúrgicos y mineralógicos (Dutrizac y Kaiman, 1976)(Dutrizac, 2004). Siendo empleados en el proceso de la industria del zinc para precipitar el hierro no deseado y otros elementos como el plomo para facilitar la etapa de filtrado (Hernández et al., 2021)(Salinas et al., 2001)(Jun et al., 2022). La figura 15 muestra un cristal de jarosita natural (Bourgoin V., 2011) donde se muestra la estructura trigonal de este mineral, así como el color amarillo rojizo característico.

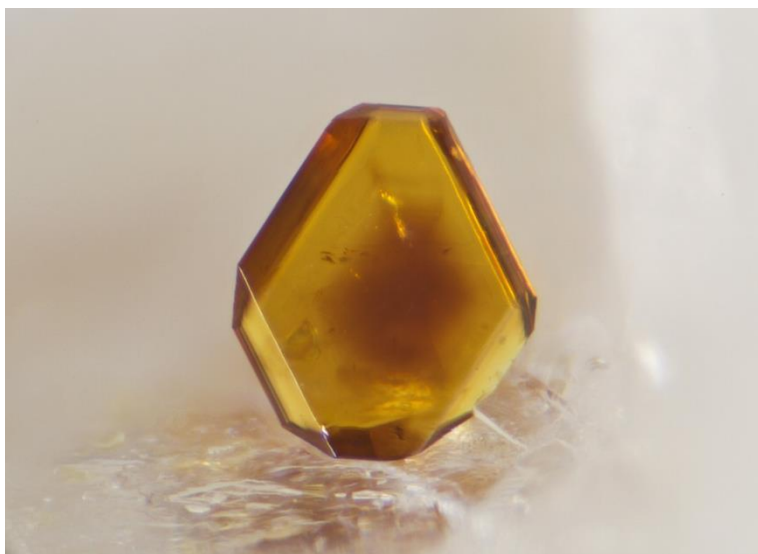


Figura 15. Cristal de jarosita de pie sobre barita encontrada en la mina “La Estrella, en las cuevas de Almanzura en Almería, Andalucía, España.(Bourgoin V., 2011).

Además, se ha abordado la recuperación de metales valiosos a partir de residuos de jarosita (Xue et al., 2011)(Pérez et al., 2012). Sin embargo, algunas investigaciones han mencionado el uso de este tipo de compuestos como ánodos y/o cátodos en baterías de iones de litio, mediante la preparación de un híbrido bidimensional de jarosita $KFe_3(SO_4)_2(OH)_6/rGO$ utilizando láminas de grafeno de una sola capa que sirven como agentes directores de estructura y plataformas de crecimiento para hacer crecer nano placas monocristalinas hexagonales. A través de un proceso de oxidación en la fase de solución a una temperatura elevada (Hernández et al., 2021)(Xu et al., 2016). Trabajos anteriores han

evaluado el efecto de dopar diferentes tipos de jarosita con elementos para modificar sus propiedades. Por ejemplo, se ha estudiado el efecto de la sustitución del 15% de Galio no magnético en el sitio de hierro en la jarosita de hidronio, teniendo un efecto similar a bajas temperaturas, aumentando la susceptibilidad magnética (Earle et al., 1999). Otro estudio ha demostrado la inserción de átomos de litio dentro de la estructura de jarosita de sodio y de amonio, teniendo resultados prometedores para su posible uso en baterías de ion litio (Sandineni et al., 2016).

Estudios recientes han demostrado que puede haber un intercambio iónico electroquímico en la jarosita, existiendo fases mixtas estructuralmente estables (Kosova et al., 2020). Por lo tanto, dopar este tipo de material con algunos elementos o compuestos podría mejorar sus propiedades y ampliar su campo de aplicación como actualmente se está investigando. Algunos de los compuestos que se evaluarán en esta investigación son: Sulfato de Calcio (CaSO_4), Sulfato de Estroncio (SrSO_4) y Sulfato de Magnesio (MgSO_4).

2.2.Principales materiales osteoinductores

Hoy en día se pueden utilizar diversos sustitutos óseos, derivados de productos biológicos, como el plasma y la hidroxiapatita o sintéticos como el sulfato de calcio y polímeros (Fernández et al, 2018). Así, la combinación de componentes orgánicos e inorgánicos generan que los andamios fabricados logren imitar el tejido óseo natural, siendo la parte orgánica quien proporciona la flexibilidad al biomaterial y mejora su biocompatibilidad mientras que la parte inorgánica le da rigidez y resistencia (Kazimierczak y Przekora, 2020). Es por ello, que en este tipo de compuestos la matriz orgánica puede estar compuesta de diversos materiales como colágeno, ácido hialurónico, polímeros sintéticos como ácido poliláctico (PLA), Policaprolactona (PCL), ácido poliglicol (PGA). Mientras que la parte inorgánica está hecha de aleaciones metálicas y cerámicas, como hidroxiapatita (fosfato de calcio), vitrocerámicas, nanotubos de carbono (Xie et al, 2020). Sin embargo, como se mencionó anteriormente la mayoría de ellos no contribuyen a la osteoinducción.

Actualmente la hidroxiapatita es el principal material utilizado en la ingeniería de tejido óseo para la creación de la matriz extracelular. Esto debido a sus propiedades de bioactividad, biocompatibilidad, osteoconductividad y osteointegración. Sobre la base de estas propiedades, la hidroxiapatita se ha utilizado como uno de los materiales más

estudiados para diversas aplicaciones biomédicas de carga. Sin embargo, obtener una fase de hidroxiapatita pura sigue siendo un desafío para los investigadores de biomateriales (Saxena & Pandey, 2021)(Figura 16). También, es difícil la fabricación de andamios con arquitectura y porosidad controladas por lo que estudios combinan materiales para mejorar esas propiedades. Por ejemplo, la unión de óxido de grafeno poroso con hidroxiapatita utilizando tecnología de luz digital (Zhao et al, 2022) mejora las capacidades mecánicas del andamio, promoviendo así la adhesión celular, la proliferación y la expresión de genes relacionados con la osteogénesis.



Figura 16. Cristal de Hidroxiapatita (fosfato de calcio). Imagen tomada de <https://wikiimg.tojsiabt.com/wikiimedia/commons/thumb/f/f8/Hydroxylapatite-338779.jpg/440px-Hydroxylapatite-338779.jpg>.

Además, existen diversos materiales cuyos estudios han demostrado tener buenas propiedades osteoinductivas como las biocerámicas de fosfato de calcio bifásico (BCP) (Li et al, 2022), donde modifican su fabricación cambiando y controlando el tamaño del poro mediante la combinación del método de formación de espuma H_2O_2 con el método de interfiltración de microesferas y sinterizados para ajustar la topografía micro-nano. Esto con el fin de tener una neovascularización temprana y osteoinductividad para aplicaciones de reparación ósea. De igual manera, los cementos de fosfato de calcio porosos inyectables tienen una composición comparable a la estructura química de los minerales óseos (Vezenkova & Locs, 2022), teniendo una capacidad para autofijarse y reabsorberse in vivo teniendo una variedad de aplicaciones potenciales en la regeneración ósea.

Otros materiales utilizados para la fabricación de andamios en la creación de la matriz extracelular son los poliméricos biorreabsorbibles, ya que cuentan con ventajas como biodegradabilidad, flexibilidad y la posibilidad de ser modificados para introducir funcionalidades específicas, empero por si solos no presentan osteoinducción. Es por ello que estudios evalúan su uso por medio de fabricaciones de andamios multicapa (Liguori et al, 2022) que consiste en una estera de nanofibras electrohiladas de poli(d,l-lactida-co-glicolida)/polietilenglicol intercaladas entre dos capas de gelatina de hidrogel enriquecido con nanopartículas de Tantalio, teniendo propiedades biomiméticas y osteoinductivas. Andamios nanofibrosos de administración de fármacos dual (Rather et al, 2022) con nanofibras de policaprolactona (PCL)-colágeno que incorpora dexametasona y simvastatina, fabricado mediante electrohilado, demostrando diferenciación osteogénica de las células derivadas del tejido adiposo al mejorar la actividad de la fosfatasa alcalina y exhibiendo propiedades inmunomoduladoras.

En 2008, un estudio realizado por Slack menciona el uso de sulfato de calcio en el campo de la medicina, siendo utilizado en una variedad de tratamientos de tejidos duros, como la reparación de defectos periodontales, el tratamiento de la osteomielitis, el aumento de senos nasales y como complemento de la colocación de implantes dentales (Slack, 2008). Asimismo, en el año 2011 Chen menciona el uso de sulfato de calcio para estimular la formación de hueso, teniendo buena biocompatibilidad y ofreciendo un entorno biológico satisfactorio para el crecimiento de hueso nuevo en los implantes. Así, se destaca la rápida reabsorción que presenta, siendo incluso más rápido que la formación de hueso nuevo in vivo (Chen et al, 2011).

Otro material estudiado en los últimos años es el estroncio cuya incorporación en cementos óseos de hidroxiapatita, ayuda a la fijación y mineralización de los osteoblastos in vitro y al crecimiento óseo y la osteointegración in vivo (Wong et al., 2004). De igual manera, presenta una gran bioactividad, aportando fuerza de unión al hueso (Ni et al, 2006). También ha sido demostrado que la hidroxiapatita que contiene estroncio estimula la actividad de los osteoblastos e inhibe la actividad de los osteoclastos cuyas células son las responsables de la reabsorción del hueso (Yang et al, 2011). También se reveló que el estroncio podría mejorar la diferenciación osteogénica de las células troncales

mesenquimales MSC (por sus siglas en inglés Mesenchymal Stem Cells) promoviendo la formación de hueso in vivo mediante la activación de la vía Wnt/b-catenina (Yang et al, 2011). Asimismo, aumenta la resistencia ósea en modelos de osteointegración y es eficaz para promover la curación y reparación de fracturas óseas (Saidak y Marie, 2012).

En el cuerpo, el estroncio se considera un elemento traza u oligoelemento ya que se necesita en cantidades pequeñas para asegurar un crecimiento y desarrollo adecuados. Es por ello que juega un papel importante en el modelado óseo encontrándose en la fase mineral del hueso. Además, la propiedad radiopaca del estroncio ayuda a facilitar la evaluación clínica (Mohan et al., 2013). Más estudios revelan que este elemento se ha utilizado en la fabricación de andamios con propiedades osteoinductoras, demostrado una buena compatibilidad con el tejido óseo reduciendo la inflamación y la osteoclastogénesis (Xu et al., 2021). Recientemente se encontró que el uso del estroncio como aditivo mejora las propiedades mecánicas, impulsa la formación ósea, previene la reabsorción ósea y favorece la proliferación celular de las MSC de médula ósea humana (Vezenkova & Locs, 2022).

Por otro lado, en el 2013 Krüger, demostró que al combinar fosfato de calcio con Magnesio incrementa la resistencia mecánica (Krüger et al, 2013). Se ha investigado que los iones de magnesio promueven la proliferación celular y, al incrementar la concentración, aumenta la diferenciación osteogénica (Li et al, 2013). Además, el mezclarlo en forma de polvo con polímeros, acelera la formación ósea (Lai et al, 2019). Así, el uso del magnesio en ortopedia ha ido incrementando en los últimos años debido a que cuenta con características favorables, como su flexibilidad, y principalmente como auxiliar en la degradación ósea. Siendo el Mg^{+2} el que presenta mejores resultados por ser un componente normal del cuerpo humano, promoviendo la osteogénesis. No obstante, también presenta algunas desventajas al degradarse muy rápido, dejando una pérdida temprana del soporte mecánico en el sitio a reparar (Xu et al, 2019). Su uso como aditivo tiene efectos como la mejora de la inyectabilidad, adhesión de células troncales mesenquimales de la médula ósea y diferenciación osteogénica a través de un mecanismo mediado por integrinas, mejora de la biodegradabilidad y promoción de la inmunomodulación antiinflamatoria (Vezenkova & Locs, 2022).

3. METODOLOGÍA

En el presente trabajo, el método de síntesis utilizado fue el mismo informado por Elías Hernández-Lazcano et al. (Hernández et al., 2021), que es una versión modificada de lo reportado por otros investigadores años antes al sintetizar jarosita de amonio en 3 horas (Das et al., 1995), variando el pH para la síntesis de jarositas de potasio estructuralmente estables (Smith et al., 2006) o modificaciones en la temperatura de trabajo (Drouet y Navrotsky, 2003). El método aquí utilizado, reduce significativamente el tiempo de reacción de 24 a solo 3 horas, la temperatura de trabajo de 97 a 70 °C, y las variaciones en el pH y los cálculos estequiométricos de los precursores. Posteriormente se realiza la preparación como biomaterial, disminuyendo la cantidad de hierro y eliminando la mayor cantidad de sulfatos con un protocolo que reduce significativamente la cantidad de agua para lograr subir el pH de las muestras de las jarositas de potasio dopadas a niveles cercanos a 7.

El diseño de esta sección de la investigación se centrará en la parte experimental de la síntesis de jarosita, así como en la caracterización de las muestras. Primero, se valorará la afectación en la síntesis de la jarosita de potasio con base en las variables independientes a evaluar (sulfato de calcio, sulfato de estroncio y sulfato de magnesio) en el sistema propuesto. Así mismo, una vez obtenidas las muestras, se realizará un ajuste en el pH de cada una de ellas, logrando alcanzar valores cercanos a 7. Posteriormente, se realizará la caracterización necesaria para obtener sus propiedades. Estimándose los resultados de cada una de las variables para cada uno de los parámetros propuestos, con la finalidad de poder correlacionar los resultados generales obtenidos con base a las mejores composiciones. Finalmente se prepararán las muestras llevando a cabo una esterilización por radiación gamma para poder realizar los ensayos biológicos.

3.1. Síntesis de jarositas de potasio dopadas

La síntesis de los compuestos tipo jarosita se realizó bajo las siguientes condiciones: 0,15 M de sulfato de hierro, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE. UU.), 0,15 M de sulfato de potasio, K_2SO_4 (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) y 0,03 M del sulfato correspondiente con el que se dopó a la jarosita; sulfato de calcio, $(\text{CaSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O})$ (Técnica Química S.A., Ciudad de México), sulfato de estroncio, SrSO_4 (Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, WI, USA) o sulfato de magnesio, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Meyer, Ciudad de México)) (Figura 17).



Figura 17. Reactivos utilizados para la síntesis de los compuestos tipo jarosita de potasio dopados.

La solución acuosa se preparó en un reactor de tres bocas de 1.0 L de capacidad con agua desionizada, y equipado con un sistema de medición de pH, manteniendo la temperatura a 70 °C y agitación mecánica continua. La figura 18 muestra la matriz experimental descrita. Además, todos los productos químicos descritos y también el hidróxido de sodio (NaOH) y el ácido sulfúrico (H_2SO_4) utilizados para ajustar el pH se compraron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.) con alta pureza (< 99%).

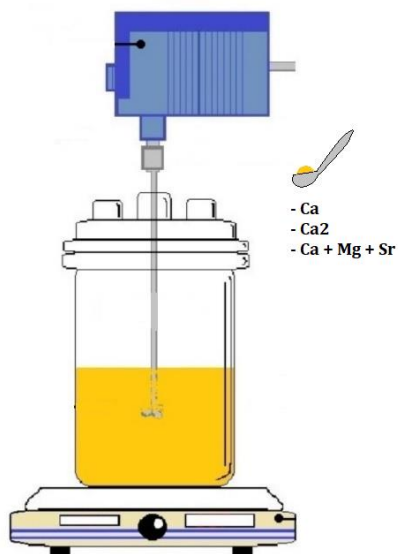


Figura 18. Esquema representativo de la síntesis de jarositas de potasio dopadas, donde se aprecia el equipo y material utilizado para la realización de su síntesis.

Una vez finalizada la reacción de síntesis, la solución permaneció en reposo por un tiempo predeterminado para evitar la coalescencia de las partículas, y posteriormente, el producto sólido fue lixiviado con medio litro de agua desionizada caliente ($>70\text{ }^{\circ}\text{C}$) para eliminar los sulfatos residuales. Se colocaron las muestras de jarosita dentro del recipiente con agua caliente para limpiarlas y al mismo tiempo subir el pH hasta niveles cercanos a 7. Luego de esto, el producto fue filtrado por vacío y secado en un horno (Lindberg ISB) durante 6 horas a temperatura $< 100^{\circ}\text{C}$ y caracterizado (figura 19).

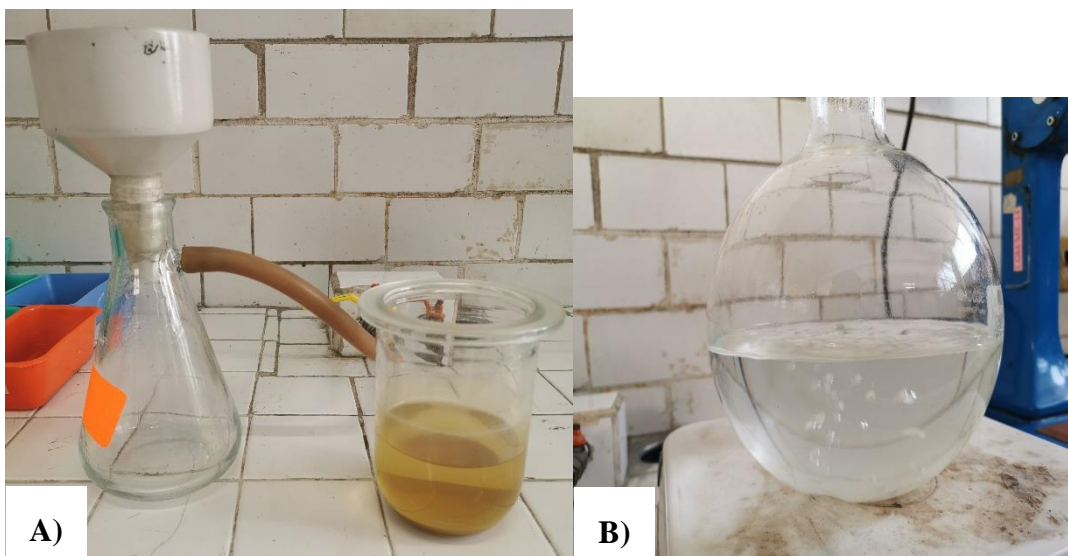


Figura 19. Filtrado del material obtenido para la eliminación de líquido y exceso de sulfatos. A) Se aprecia el sistema de filtrado por vacío mientras que en la imagen B) se puede observar agua desionizada a punto de ebullición para la eliminación de sulfatos.

3.2. Caracterización de las muestras

En cuanto a los protocolos utilizados para las técnicas analíticas utilizadas para la caracterización de sólidos, las muestras se prepararon por tamizado hasta alcanzar tamaños de partícula inferiores a 75 μm , y luego se secaron a 100 °C durante 6 h en una estufa de laboratorio con control digital.

3.2.1. Difracción de Rayos X

El método de análisis utilizado para la caracterización fue el siguiente: Difracción de rayos X utilizando un Difractómetro INEL modelo Equinox 2000 (figura 20) ubicado en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (AUSH), México y fabricado por INEL en Artenary, Centro Val de Loire, Francia. Cuyo filamento es de Cobalto y con tiempos de barrido de 10 min para cada muestra. La indexación de los difractogramas obtenidos se realizó con el software MATCH versión 1.1 (desarrollado por Crystal Impact, Bonn, Alemania), y haciendo un refinamiento rietvelt para determinar porcentajes de cristalinidad y tamaños de cristal para cada muestra.



Figura 20. Difractómetro de Rayos X Equinox 2000 (INEL, Artenay, Francia) con radiación $\text{CoK}\alpha_1$ (1.79026 Å).

3.2.2. Microscopía Electrónica de Barrido

Por otro lado, el estudio morfológico realizado a las muestras se ejecutó utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-IT300 (figura 21), fabricado por JEOL Tokyo, Japón (ubicado en la Escuela Superior de Apan, UAEH), equipado con un dispersor de energía Oxford. espectrometría (EDS). Se colocaron 10 mg de material en polvo en un portamuestras y se recubrieron con oro para su análisis, utilizando un voltaje de operación de 20 keV. Realizándose mapeos y lecturas puntuales para determinar el porcentaje semicuantitativo elemental de las muestras.

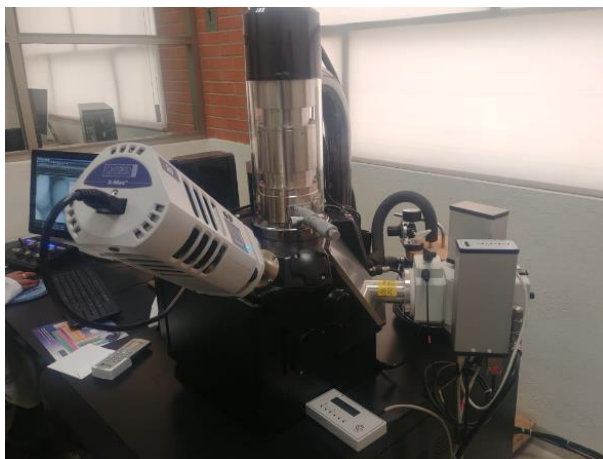


Figura 21. Microscopio Electrónico de Barrido JEOL modelo JSM-6300.

3.2.3. Espectroscopía FTIR

Finalmente, para completar y confirmar la presencia de los elementos dopados en la estructura de la jarosita, se realizó un examen infrarrojo por transformada de Fourier de reflectancia total (ATR-IFTR). Se completó utilizando un espectrómetro FTIR Perkin Elmer Frontier (figura 22) (Watham, MA, EE. UU.), y se colocaron cuidadosamente 10 mg de la muestra en polvo sobre la superficie del cristal y cada espectro obtenido se registró como absorbancia por debajo del 75 %. Cada espectro se escaneó entre 4000 y 400 cm^{-1} de longitudes de onda.



Figura 22. FTIR Perkin Elmer Frontier.

3.3. Ensayos biológicos de las jarositas.

En este capítulo se abordarán los ensayos in vitro realizados en las muestras de jarosita para aplicaciones con enfoque biológico. Se utilizaron dos tipos de células troncales: (1) Células troncales de pulpa dental porcina (SDPSC, por sus siglas en inglés *Swine Dental Pulp Stem Cells*), para determinar su citotoxicidad, realizando ensayos de proliferación celular con el fin de conocer la viabilidad como biomaterial de las muestras de jarosita de potasio dopadas. (2) Células troncales de folículo dental humano (DFSC, por sus siglas en inglés *Dental Follicle Stem Cells*), con el propósito de evaluar la capacidad de las muestras de jarosita de potasio dopadas como material osteoinductor para diferenciar las DFSC a linaje osteogénico, por medio de ensayos colorimétricos, rojo de alizarina.

3.3.1. Ensayo MTT

El ensayo metabólico celular colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) se utilizó para medir el posible efecto citotóxico de la jarosita de potasio dopada en células troncales de pulpa dental porcina (SDPSC), basado en la conversión de MTT en cristales de formazán por células vivas, lo que determina la actividad mitocondrial (Meerlo et al., 2011). Durante la optimización del protocolo recomendado por diversos estudios, así como del proveedor (Sigma-Aldrich), se deben tener en cuenta los siguientes parámetros: (1) la concentración de MTT utilizada, (2) la duración del período de incubación, (3) el número de células viables, (4) la actividad metabólica de las células, (5) la cantidad de polvo (jarosita) utilizada y (6) el filtrado de la solución para evitar errores en la lectura de la absorbancia (Figura 23). La duración del período de incubación es muy crítica, ya que la conversión de MTT en formazán por las células en cultivo depende del tiempo y al mismo tiempo, los reactivos de detección son de naturaleza citotóxica, por lo que el tiempo de incubación se limitó a 3, 7 y 10 días.

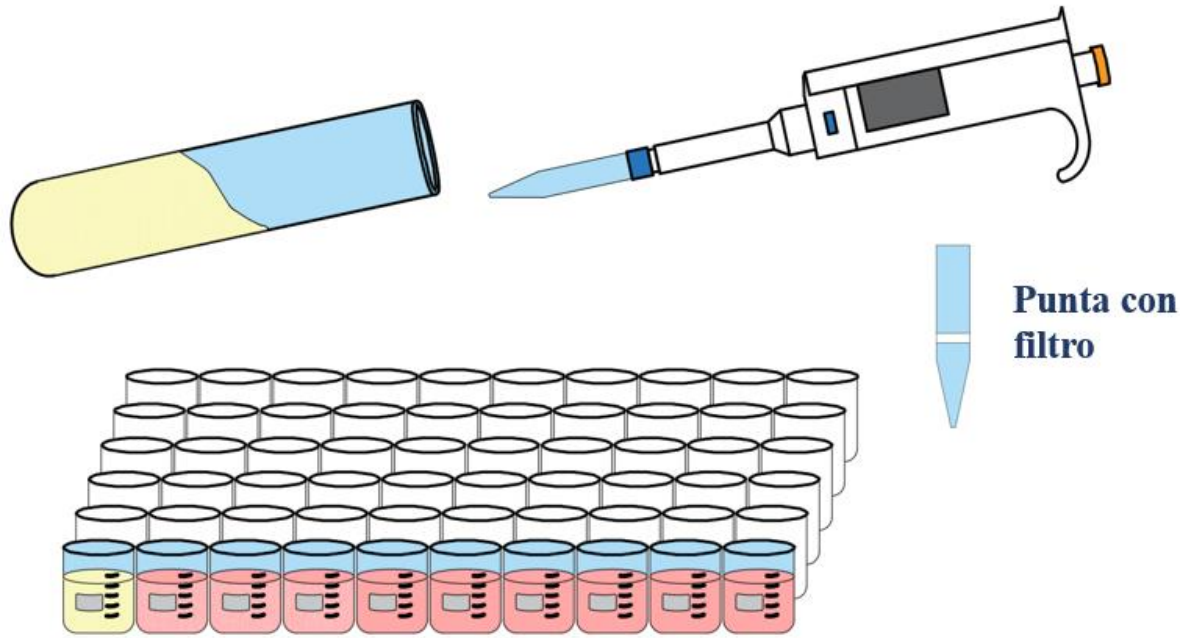


Figura 23. protocolo de ensayo MTT modificado donde los cristales formados se filtraban a través de unas puntas con filtro para evitar que el polvo de jarosita pasara a los pocillos donde se realizaría la lectura de la placa.

Las células se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos a una densidad de 4000 células/pocillo y se cultivaron en el medio. En todos los casos las células fueron cultivadas en DMEM bajo en glucosa (Bio-west, Ciudad de México), Suero Fetal Bovino (FBS) al 10% (Bio-west, Ciudad de México) y penicilina-estreptomina al 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) e incubadas las 24 h a 37 °C, 5 % de CO₂. Las muestras de jarosita se agregaron después de 24 h con un volumen de 5 mm³ por pocillo utilizando una herramienta hecha a medida de acero inoxidable y con capacidad de 1 mm³ (figura 24).

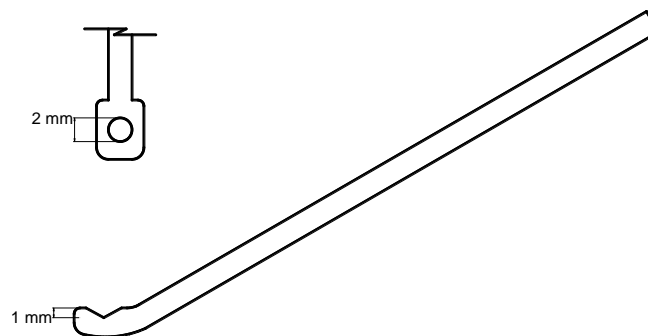


Figura 24. Prototipo de acero inoxidable para el control de medición de la cantidad de jarosita a evaluar.

La distribución de los grupos se observa en la figura 25, donde podemos apreciar medio de cultivo (DMEM) colocado solo en el pocillo, como grupo 1. Posteriormente, para cada muestra de jarosita el acomodo de grupos fue: jarosita más PBD como grupo 2; Jarosita más DMEM como grupo 3; Células más DMEM como grupo 4 y finalmente, Células más Jarosita más DMEM como grupo 5. El experimento se completó por triplicado y las placas de pocillos se incubaron a diferentes tiempos: 3, 7 y 10 días a 37 °C, 5 % de CO₂. Luego, a cada de esos días, las células se incubaron con una solución de Cell Proliferation Kit (MTT) (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Germany) al 10% durante 4 h a 37 °C protegidas de la luz. Finalmente, se añadió isopropanol para solubilizar las sales de formazán. La solución se pasó a otra placa de 96 pocillos donde se utilizó un ajuste al protocolo recomendado por el proveedor y diferentes estudios (Roche, 2020). Pasando la solución a través de unas puntas con filtro para pipeta electrónica, esto con la finalidad de evitar que el polvo de jarosita pasara junto a la solución, produciendo aumentos en las lecturas del equipo. Así se pudo determinar la medición de la actividad metabólica de una manera precisa, sin contar con errores de lectura debido a la presencia del polvo de jarosita en la solución. La actividad metabólica se midió con un lector de placas Elisa (Biotek Elx808, EE. UU.) equipado con un filtro de 562-630 nm.

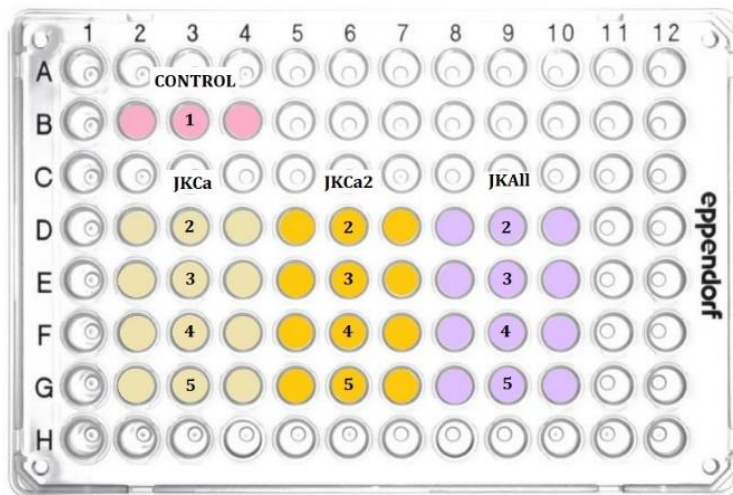


Figura 25. Distribución de los grupos para el ensayo de MTT; 1) DMEM; 2) Jarosita + PBS; 3) Jarosita + DMEM; 4) Células + DMEM; 5) Células + Jarosita + DMEM.

3.3.2. Ensayo de diferenciación osteogénica

Las células se sembraron a una densidad de 5000 células de DPSC en placas de 24 pocillos y se cultivaron con DMEM bajo en glucosa (Bio-west, Ciudad de México), complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS) (Bio-west, Ciudad de México) y penicilina-estreptomicina al 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5% bajo humidificación durante 24 h. Pasado ese tiempo, se evaluaron en tres grupos como se explica a continuación (Figura 26): células del pozo solas cultivadas con DMEM bajo en glucosa (Bio-west, Ciudad de México), suplementadas con Suero Fetal Bovino (FBS) al 10% (Bio-west, México) y penicilina-estreptomicina al 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) (grupo A); y jarosita (10 mm³/pozo) y DMEM bajo en glucosa (Bio-west, Ciudad de México), suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS) al 10% (Bio-west, Ciudad de México) y penicilina-estreptomicina al 1% (Sigma Aldrich , St. Louis, MO, EE. UU.) (grupo B); y células, jarosita y medio de diferenciación osteogénica MesenCultTM (que consta de medio basal, 15 µl de dexametasona, 250 µl de ácido ascórbico, 175 µl de glicerofosfato y 7,5 ml de suplemento estimulante osteogénico MesenCultTM (Stem Cells Technologies, Cambridge, MA, EE. UU.) (grupo C). La placa se incubó a 37 °C, 5% CO₂ bajo humidificación y se cambió el medio de cultivo una vez por semana durante 28 días.



Figura 26. Caja de 24 pozos con los grupos a evaluar; grupo A: células + DMEM; grupo B: células + jarosita + DMEM; grupo C: células + jarosita + medio de diferenciación osteogénico.

Pasados los 28 días se llevó a cabo la evaluación de la diferenciación osteogénica de las DPSC mediada por la jarosita, con la tinción rojo de alizarina (ARS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) coloreó depósitos de calcio de forma selectiva, y se ha utilizado durante décadas para evaluar depósitos ricos en calcio en cultivos celulares (Puchtler, 1969) de la placa de pozo, y luego las células se fijaron durante 20 min con formalina neutra al 3,74% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Además, se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (Bio-west, Ciudad de México), y además fue lavado con agua destilada para eliminar los restos de sal. Se añadió una solución de ARS al 2% p/v, con pH ajustado 4.2, de manera que cubriera toda la superficie de la jarosita. Después de 60 min de incubación a temperatura ambiente, el exceso de ARS se lavó con agua. Se tomaron imágenes de la tinción ARS utilizando un microscopio óptico de contraste de fase de campo de luz invertido Leica DM IL LED. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Asimismo, se realizó un sembrado a una densidad de 3,000 células troncales de folículo dental humano (CTFD) en placas de 96 pocillos y se cultivaron con DMEM bajo en glucosa (Bio-west, Ciudad de México), complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) (Bio-west, Ciudad de México) y penicilina-estreptomicina al 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5% bajo humidificación durante 24 h. Pasado ese tiempo, se evaluaron en nueve grupos como se explica a continuación (Figura 27): El grupo A como grupo control contiene células en pozo solas cultivadas con DMEM bajo en glucosa (Bio-west, Ciudad de México), suplementadas con Suero Fetal Bovino (FBS) al 10% (Bio-west, México) y penicilina-estreptomicina al 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.); el grupo B contiene jarosita (1.5 mm³/pozo) y DMEM bajo en glucosa (Bio-west, Ciudad de México), suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS) al 10% (Bio-west, Ciudad de México) y penicilina-estreptomicina al 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.); el grupo C con células, jarosita (1.5 mm³/pozo) y medio de diferenciación osteogénica MesenCult™ (que consta de medio basal, 15 µl de dexametasona, 250 µl de ácido ascórbico, 175 µl de glicerofosfato y 7,5 ml de suplemento estimulante osteogénico MesenCult™ (Stem Cells Technologies, Cambridge, MA, EE. UU.); el grupo D contiene jarosita (3.0 mm³/pozo) y DMEM bajo en glucosa (Bio-west, Ciudad de México), suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS) al 10% (Bio-west,

Ciudad de México) y penicilina-estreptomicina al 1% (Sigma Aldrich , St. Louis, MO, EE. UU.); el grupo E con células, jarosita (3.0 mm³/pozo) y medio de diferenciación osteogénica MesenCultTM (que consta de medio basal, 15 µl de dexametasona, 250 µl de ácido ascórbico, 175 µl de glicerofosfato y 7,5 ml de suplemento estimulante osteogénico MesenCultTM (Stem Cells Technologies, Cambridge, MA, EE. UU.); el grupo F contiene jarosita (4.5 mm³/pozo) y DMEM bajo en glucosa (Bio-west, Ciudad de México), suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS) al 10% (Bio-west, Ciudad de México) y penicilina-estreptomicina al 1% (Sigma Aldrich , St. Louis, MO, EE. UU.); el grupo G con células, jarosita (4.5 mm³/pozo) y medio de diferenciación osteogénica MesenCultTM (que consta de medio basal, 15 µl de dexametasona, 250 µl de ácido ascórbico, 175 µl de glicerofosfato y 7,5 ml de suplemento estimulante osteogénico MesenCultTM (Stem Cells Technologies, Cambridge, MA, EE. UU.); el grupo H contiene jarosita (6.0 mm³/pozo) y DMEM bajo en glucosa (Bio-west, Ciudad de México), suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS) al 10% (Bio-west, Ciudad de México) y penicilina-estreptomicina al 1% (Sigma Aldrich , St. Louis, MO, EE. UU.); y el grupo I con células, jarosita (6.0 mm³/pozo) y medio de diferenciación osteogénica MesenCultTM (que consta de medio basal, 15 µl de dexametasona, 250 µl de ácido ascórbico, 175 µl de glicerofosfato y 7,5 ml de suplemento estimulante osteogénico MesenCultTM (Stem Cells Technologies, Cambridge, MA, EE. UU.).

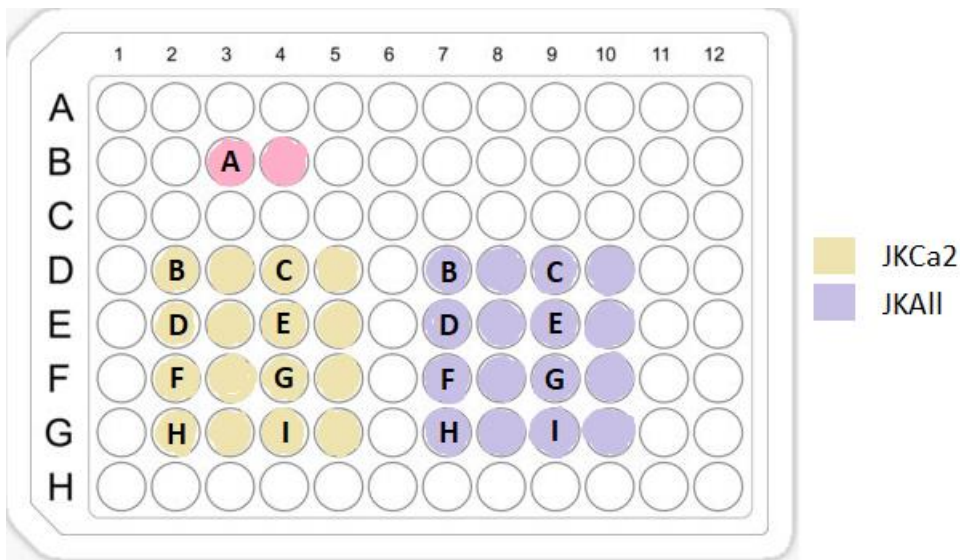


Figura 27. Caja de 96 pozos con los grupos a evaluar; grupo A: células + DMEM; grupo B: células + jarosita 1.5mm³+DMEM; grupo C: células + jarosita 1.5 mm³ + medio de diferenciación

osteogénico; grupo D: células + jarosita 3.0 mm³ + DMEM; grupo E: células + jarosita 3.0 mm³ + medio de diferenciación osteogénico; grupo F: células + jarosita 4.5 mm³ + DMEM; grupo G: células + jarosita 4.5 mm³ + medio de diferenciación osteogénico; grupo H: células + jarosita 6.0 mm³ + DMEM; grupo I: células + jarosita 6.0 mm³ + medio de diferenciación osteogénico.

Pasados los 28 días se llevó a cabo la evaluación de la diferenciación osteogénica de las CTFD mediada por la jarosita, con la tinción rojo de alizarina (ARS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Las células se fijaron 20 min con formalina neutra al 3,74% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) durante 5 min. Además, se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (Bio-west , Ciudad de México), y además lavado con agua destilada para eliminar los restos de sal. Se añadió una solución de ARS al 2% p/v, con pH ajustado 4,2, de manera que cubriera toda la superficie de la jarosita. Después de 60 min de incubación a temperatura ambiente, el exceso de ARS se lavó con agua. Se tomaron imágenes de la tinción ARS utilizando un microscopio óptico de contraste de fase de campo de luz invertido Leica DM IL LED. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

4. RESULTADOS

4.1. Síntesis de las jarositas de potasio dopadas

Se obtuvieron tres muestras de jarosita, denominadas JKCa para la jarosita de potasio dopada con calcio, JKCa2 para la jarosita de potasio dopada con calcio al doble de molaridad, y JKAll para la jarosita de potasio dopada con calcio, estroncio y magnesio, como se muestran en la Figura 28. Una vez sintetizadas, el pH correspondiente se midió con un medidor de pH (Dual Star PH/ISE con electrodo y sonda ATC marca Thermo Orion, fabricado por ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), obteniendo valores de 3, 3.5 y 3.2, respectivamente. De acuerdo con estos resultados, las muestras se lavaron con agua desionizada a temperatura de ebullición bajo agitación mecánica y se agregaron al resto de la solución durante 2 a 3 min, finalmente filtrándose para lograr el secado de las muestras. El proceso de lavado se completó dos veces y nuevamente se midió el pH hasta

obtener valores de 6.9 para JKCa, 7.2 para JKCa2 y 7.4 para JKAlI, los cuales son aceptables para ensayos celulares.

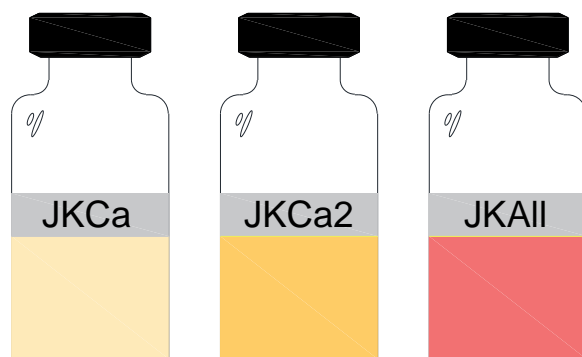


Figura 28. Muestras de compuestos tipo jarosita dopados obtenidos tras la síntesis.

4.2.Composición química

4.2.1. Microscopía Electrónica de Barrido MEB

Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) en conjunto con la espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) para principalmente evaluar, analizar y observar las propiedades morfológicas y composicionales, semi-cuantitativamente, de los polvos de jarosita dopada obtenida, con el fin de interpretar su relación con las propiedades estructurales y corroborar la adecuada incorporación de elementos dopados a la estructura correspondiente. Las muestras se prepararon colocándose en un porta muestras con capacidad para 10 ensayos, siendo recubiertas con oro durante 1 minuto aproximadamente.

4.2.1.1. Jarosita de Potasio dopada con Calcio JKCa

La Figura 29 muestra la imagen de microscopía electrónica de barrido para la muestra JKCa, donde se aprecia su morfología cuasi-esférica, teniendo tamaños de grano diversos que van de 1- 10 micras y tendiendo a aglomerarse como corresponde a la jarosita potásica reportada en estudios anteriores (Hernández et al, 2021)(Dutrizac y Jambor, 2000)(Sasaki y Konno, 2000). Las condiciones de trabajo fueron de 20 kV con una distancia de campo de 11.3 mm a unas 5,000 maximizaciones como se puede observar en la micrografía. Se puede apreciar la tendencia que tienen los cristales de jarosita a agruparse principalmente entre ellos en forma de nódulos, pero en este caso se aprecia una aglomeración sobre los cristales de sulfato de calcio.

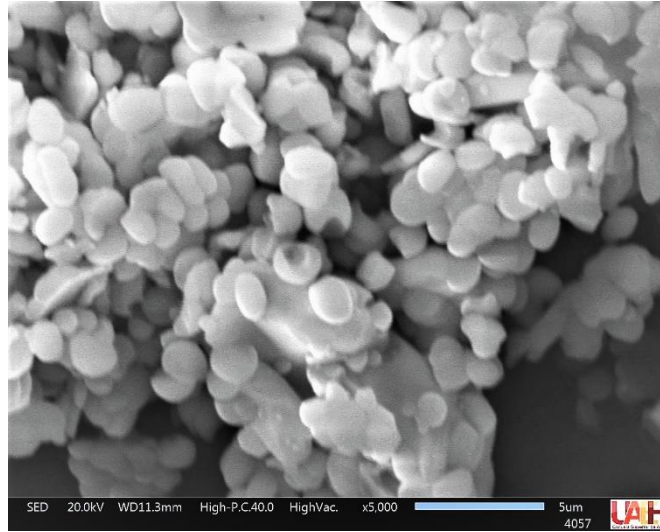


Figura 29. Micrografía de la muestra JKCa donde se aprecia la morfología cuasi esférica de las partículas de jarosita solas o aglomerándose alrededor de algunos sulfatos de calcio de forma cilíndrica.

Podemos apreciar que algunas partículas de jarosita se encuentran aglomeradas entre ellas o rodeando lo que parece ser sulfato de calcio, debido a la forma cilíndrica que tienen (Cabanas et al, 2002), recubriéndolo por completo y creando formas más grandes y amorfas. Así mismo, la figura 30 nos muestra los resultados obtenidos por energías dispersivas de Rayos X (EDS) donde se puede observar el espectro del análisis semicuantitativo elemental (% en peso) que se llevó a cabo de manera puntual a la muestra. Por otro lado, en la figura 31 podemos observar el mapeo realizado en el mismo sitio, donde se da una idea de la distribución elemental en la topografía de las partículas, así como la confirmación de la incorporación de estos dentro de la muestra.

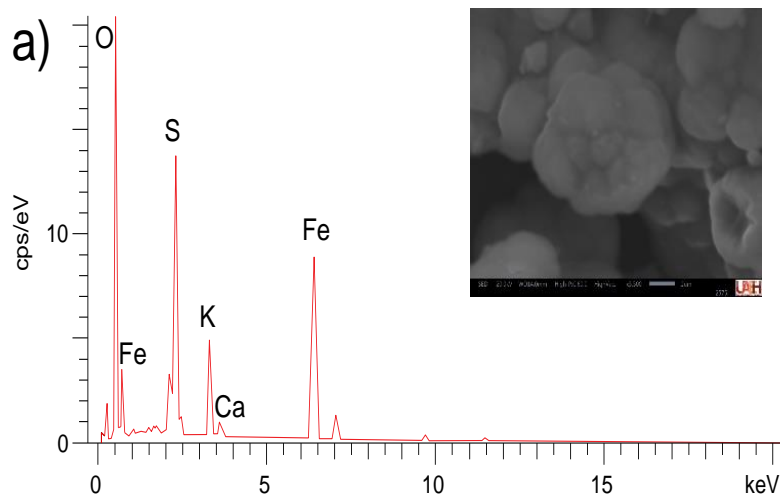


Figura 30. Espectro EDS (SEM) que muestran la composición química semicuantitativa del compuesto tipo jarosita dopada con calcio (JKCa) ⁴⁴

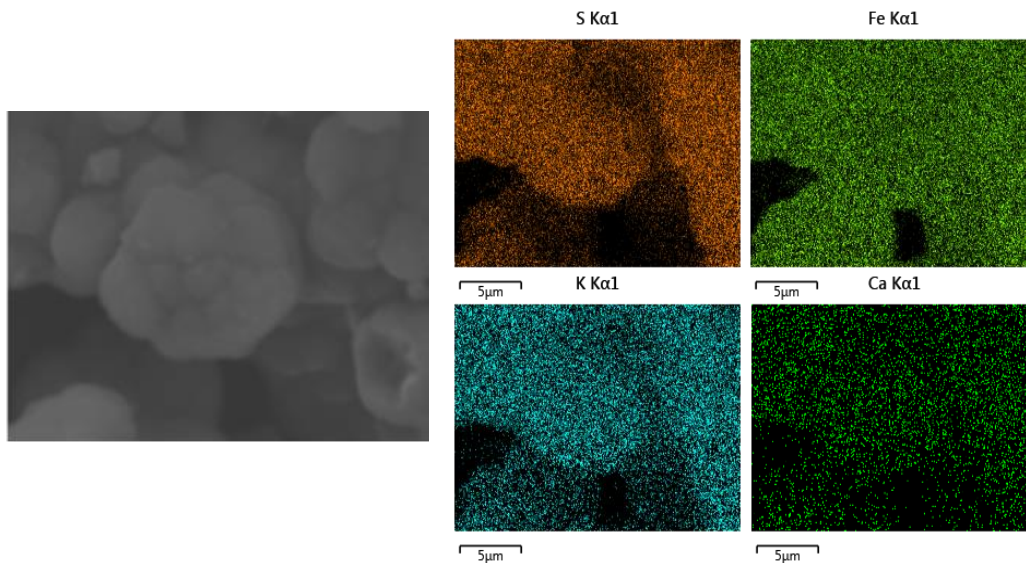


Figura 31. Mapeo realizado en la muestra de JKCa donde se puede apreciar la presencia de los elementos S, Fe, K y Ca.

4.2.1.2. Jarosita de Potasio dopada con el doble de Calcio JKCa2

En la Figura 32 podemos ver la imagen tomada con el microscopio electrónico de barrido de la muestra de JKCa2 donde se aprecia el cambio de la morfología de la jarosita a diferencia de la muestra de JKCa, observándose formas que ya no son tan redondeadas sino ligeramente más alargadas. Teniendo algunos grupos de partículas aglomeradas que muestran un patrón de crecimiento lineal sobre un cilindro de sulfato de calcio, envolviéndolo. A diferencia de la muestra anterior se aprecian en mayor cantidad debido a que la cantidad asignada a esta muestra es mayor. Así mismo, se notan algunos puntos brillantes que corresponden al calcio dentro de la estructura.

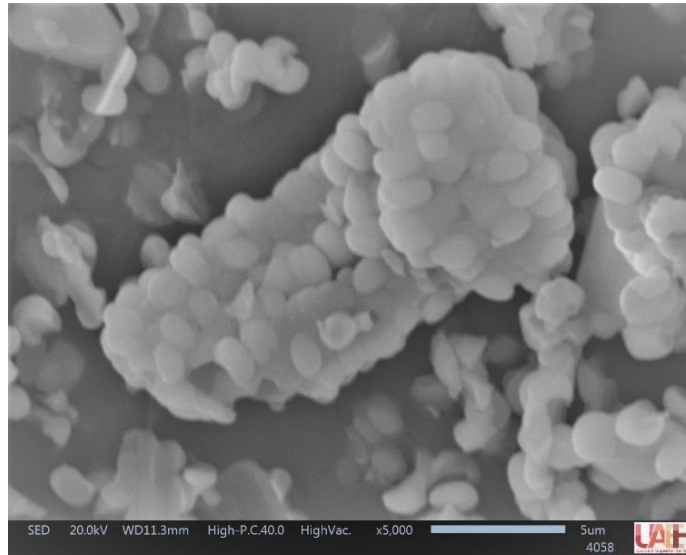


Figura 32. Micrografía de la muestra JKCa2 donde se aprecia la morfología aún casi esférica de las partículas de jarosita solas, pero en mayor cantidad aglomeradas alrededor de algunos sulfatos de calcio de forma cilíndrica.

Se notan muchas de esas formas medio alargadas debido a la mayor presencia de sulfato de calcio agregado en la síntesis y retenido en la muestra. Corroborando con los resultados de la espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS) mostrados en la figura 33, el espectro muestra el porcentaje en peso semicuantitativo elemental de la muestra, así como el mapeo realizado sobre la muestra dando una interpretación de la distribución e incorporación elemental en su topografía (figura 34).

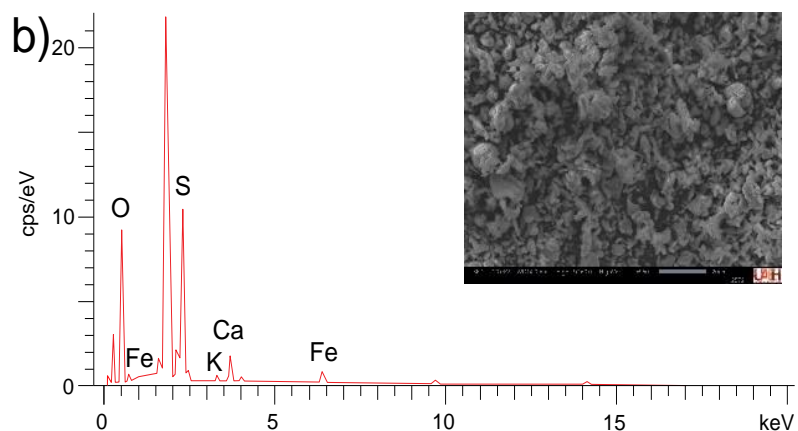


Figura 33. Espectros EDS (SEM) que muestran la composición química semicuantitativa de los compuestos tipo jarosita dopados: (a) JKCa; (b) JKCa2; y (c) JKAl.

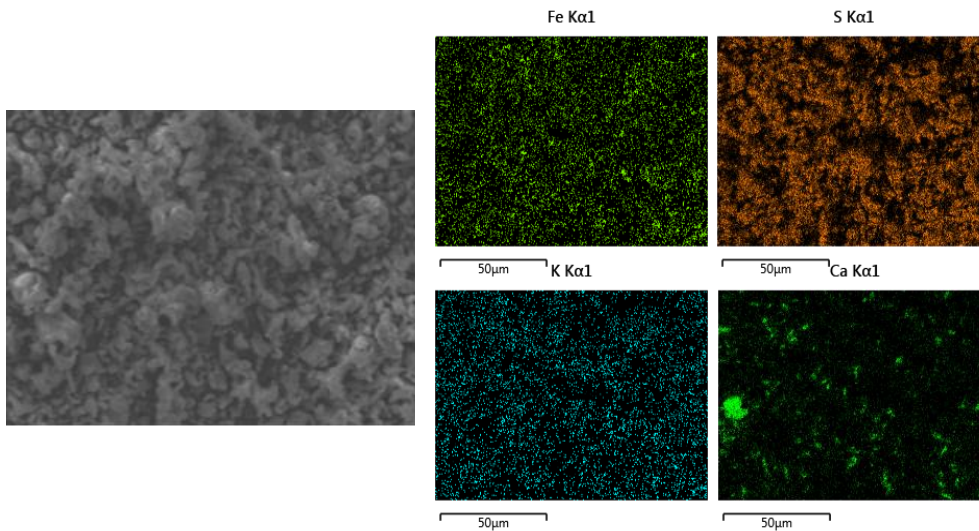


Figura 34. Mapeo realizado en la muestra de JKCa2 donde se puede apreciar la presencia de los elementos S, Fe, K y Ca.

4.2.1.3. Jarosita de Potasio dopada con Calcio, Estroncio y Magnesio JKAlI

En el caso de la muestra de JKAlI, la Figura 35 nos muestra la imagen de microscopía electrónica de barrido, donde podemos observar que existe un cambio en la morfología de la muestra, la cual, podría deberse a un cambio en la estructura cristalina. En esta micrografía también se pueden observar tamaños de partículas más pequeñas ($<1 \mu\text{m}$) y aglomeraciones mayores de $10 \mu\text{m}$, con un tamaño de grano promedio de $7 \mu\text{m}$. Además, se puede notar que la presencia de grandes partículas que contienen Sr, Mg y Ca en una morfología no redondeada sino más bien con bordes rectos definidos característicos de celdas ortorrómbicas, las cuales podrían representar una nueva fase, junto con partículas de jarosita antes mencionadas dando una mezcla de dos soluciones sólidas.

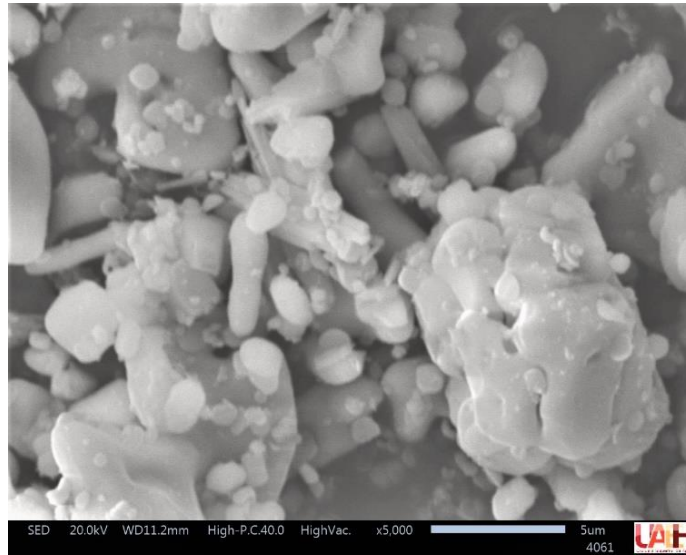


Figura 35. Micrografía de la muestra JKCa2 donde se aprecia la morfología aún casi esférica de las partículas de jarosita solas, pero en mayor cantidad aglomeradas alrededor de algunos sulfatos de calcio de forma cilíndrica.

De igual forma, en la imagen se puede apreciar la presencia de puntos brillantes que podrían deberse a la existencia de calcio, estroncio y magnesio, incorporados a la estructura de la jarosita como se comprueba en el análisis de espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS) (figura 36) donde podemos ver el espectro (% en peso) de la muestra y el mapeo realizado sobre la misma para la interpretación de la distribución elemental en su topografía (figura 37).

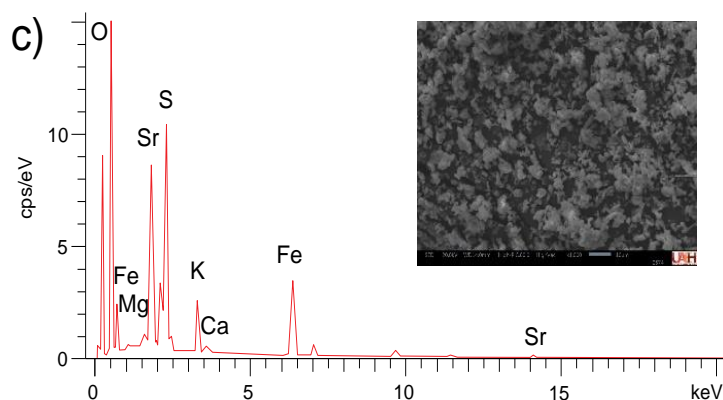


Figura 36. Espectros EDS (SEM) que muestran la composición química semicuantitativa de los compuestos tipo jarosita dopados: (a) JKCa; (b) JKCa2; y (c) JKAll.

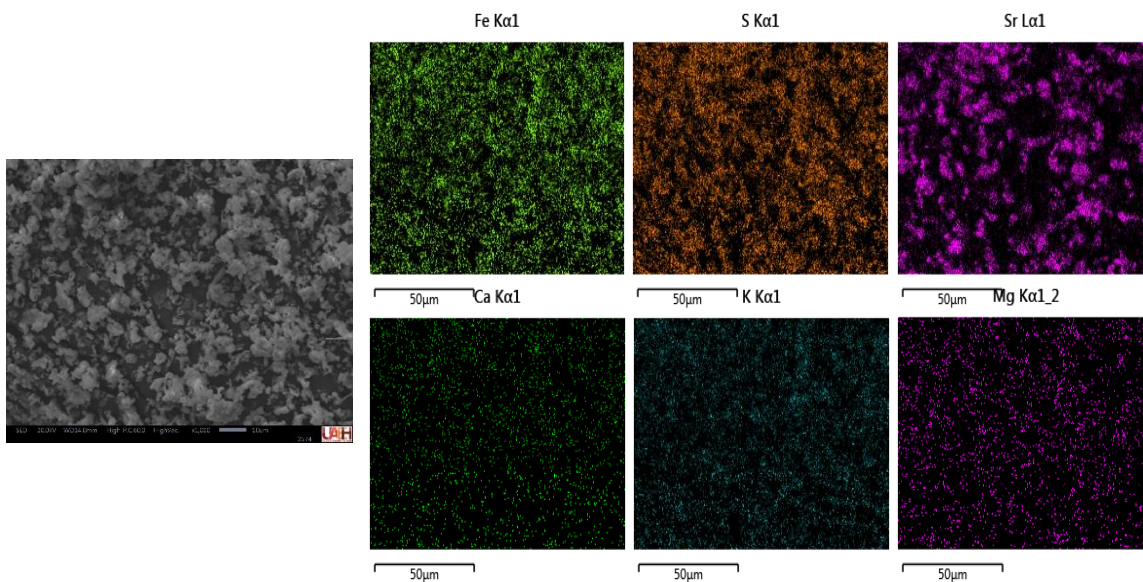


Figura 37. Mapeo realizado en la muestra de JKAlI donde se puede apreciar la presencia de los elementos S, Fe, K, Ca, Sr y Mg.

Lo anterior también se puede observar en la tabla 4 donde se muestran los resultados obtenidos de porcentaje en peso semicuantitativo elemental en cada muestra.

Tabla 4. Composición química semi cuantitativa elemental por energía dispersiva de las muestras de jarosita (porcentaje en peso % Wt).

Jarosita\Elemento	O	S	K	Fe	Ca	Sr	Mg	Total
JKCa	48.85	12.67	5.96	35.10	0.43	-	-	100
JKCa2	64.45	24.00	0.79	6.08	4.67	-	-	100
JKAlI	51.09	13.08	3.65	15.76	0.17	16.19	0.06	100

La muestra JKCa contiene una mayor cantidad de hierro y potasio a diferencia de las otras dos muestras, pero una cantidad menor de azufre. Las 3 muestras contienen Calcio en su estructura siendo la muestra JKCa2 la que mayor cantidad de este elemento logró incorporar. La muestra JKAll contiene una gran cantidad de estroncio que se incorporó en su estructura, lo cual podría indicar el cambio en la morfología mostrado en la figura 35.

4.2.2. Espectroscopía FTIR.

De acuerdo con los resultados obtenidos ejecutados por ATR-FTIR, se obtuvo más información relacionada con la composición química de las muestras en cuanto a la incorporación o no de los elementos dopados. Los cambios en la frecuencia de las bandas de absorción y las intensidades relativas de las bandas indican cambios en la estructura o cambios en el entorno de las muestras (Anderson y Voskerician, 2010). A través de la radiación electromagnética, la región IR se extiende de 10 a 13 000 cm^{-1} y solo la región IR media (400–4000 cm^{-1}) se utiliza en el análisis IR convencional, porque la vibración fundamental o los grupos funcionales que están sujetos a análisis, pertenecen a esta región (Settle, 1997).

La Figura 38 representa los espectros IR de tres muestras y un control de jarosita de potasio. Se puede observar que los espectros IR de JKCa y JKCA2 son muy similares a los de la jarosita potásica.

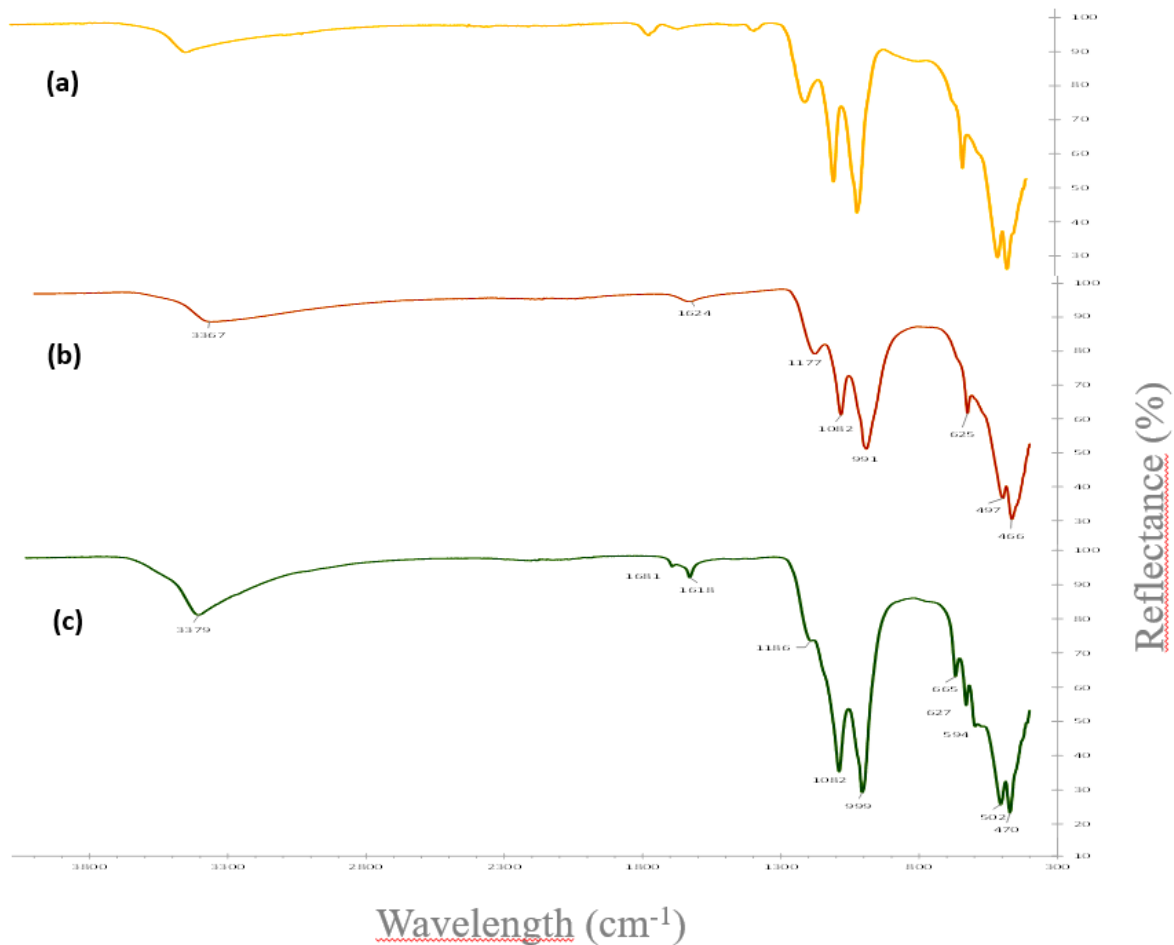


Figura 38. Espectros FTIR de: (a) jarosita de potasio, (b) JKCa, (c) JKCa2 y (d) JKAlI

De acuerdo con lo anterior, para el caso de JKCa y JKCa2, ambas presentan bandas de absorción con formas y posiciones comparables, y solo aparecen unos pocos picos de sulfato de calcio cerca de 590, 660 y 1600 cm^{-1} (Kamaraj et al., 2017). Por otro lado, JKAlI muestra un espectro típico del sulfato de estroncio (Chemical book, 2022). La Figura 39a muestra solo una banda, que se debe principalmente al modo de estiramiento de OH estructural e incluye modos de agua, especialmente para las muestras sintéticas. Los espectros de reflectancia en esta región están casi saturados para estos sulfatos.

Las características espectrales observadas en las tres jarositas surgen de las oscilaciones del enlace S-O del anión sulfato a aproximadamente 1100–1200 cm^{-1} (Lane y Christensen, 1998) debido al estiramiento asimétrico (Figura 39b). Además, las características de 680 y 600 cm^{-1} son componentes del modo normal de vibración (Vasallo y Finnie, 1992) (Figura

38d), y los movimientos de flexión simétricos cercanos a los 450 cm^{-1} (Herzberg y Crawford, 1946) (Figura 39d). Además, en la misma figura, dos picos cercanos a los 900 cm^{-1} probablemente pertenecen al sulfato de magnesio (Chemical Book, 2022). Por otro lado, en la Figura 39c, se pueden observar dos bandas características de sulfato de calcio (Kamaraj et al., 2017), aproximadamente $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$, principalmente en JKCa2 y JKAl1. En JKCa, hay una banda ancha (1630 cm^{-1}) característica de la jarosita de potasio, como la que se muestra en los espectros de control, complementada así con los resultados obtenidos en SEM (Figura 29), donde el crecimiento de las partículas de jarosita a lo largo del sulfato de calcio puede ser observado.

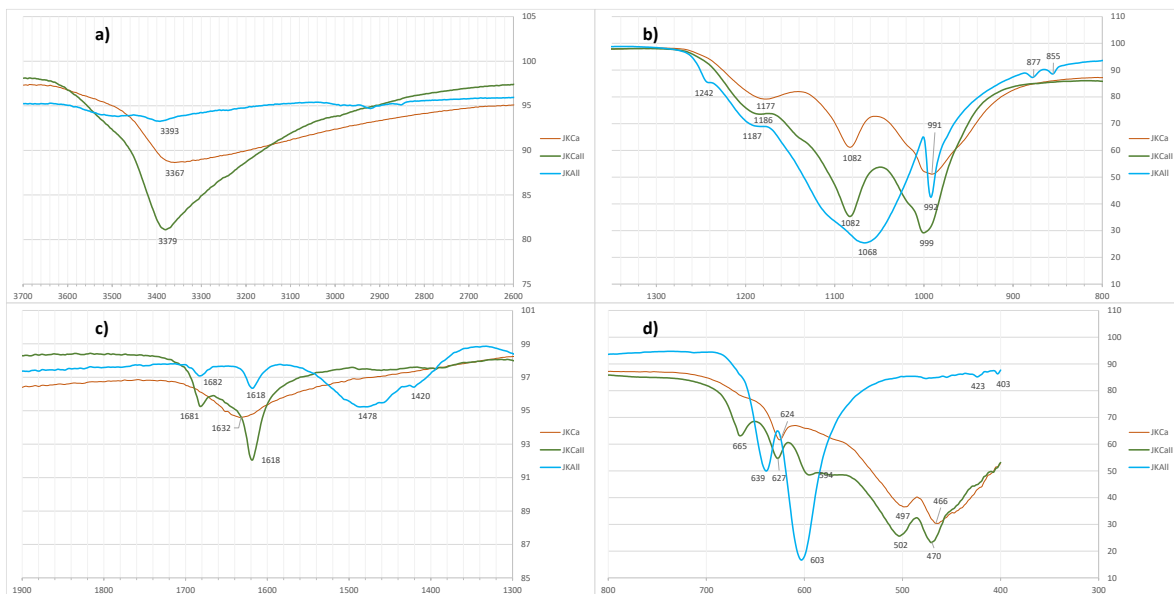


Figura 39. Espectros comparativos obtenidos (a–d) para el correspondiente espectro de Jarosita de Potasio.

4.3. Caracterización mineralógica

4.3.1. Difracción de Rayos X

La Figura 40 muestra los resultados de XRD obtenidos para compuestos tipo jarosita dopados sintetizados. Se puede observar que para la muestra de JKCa (Figura 40a), el patrón típico obtenido es el de la jarosita potásica, pero con un ligero desplazamiento hacia la izquierda, lo que podría deberse a la expansión de la celda por la presencia de átomos de calcio en la estructura de la jarosita (sistema cristalino trigonal), confirmando el dopaje con Ca.

Por otro lado, la muestra JKCa2 muestra un espectro diferente (Figura 40b) al de una jarosita de potasio, mostrando un patrón característico de células trigonales de células ortorrómbicas. Finalmente, se encuentra una fase de jarosita potásica en conjunción con otra de sulfato cálcico, así como algunos picos de fases cálcicas con superposición de azufre y en la jarosita formada previamente. Teniendo esto en cuenta, se podría considerar que la adición de cantidades superiores de calcio (superiores a las estequiométricas) durante la síntesis puede modificar la estructura cristalina de la jarosita.

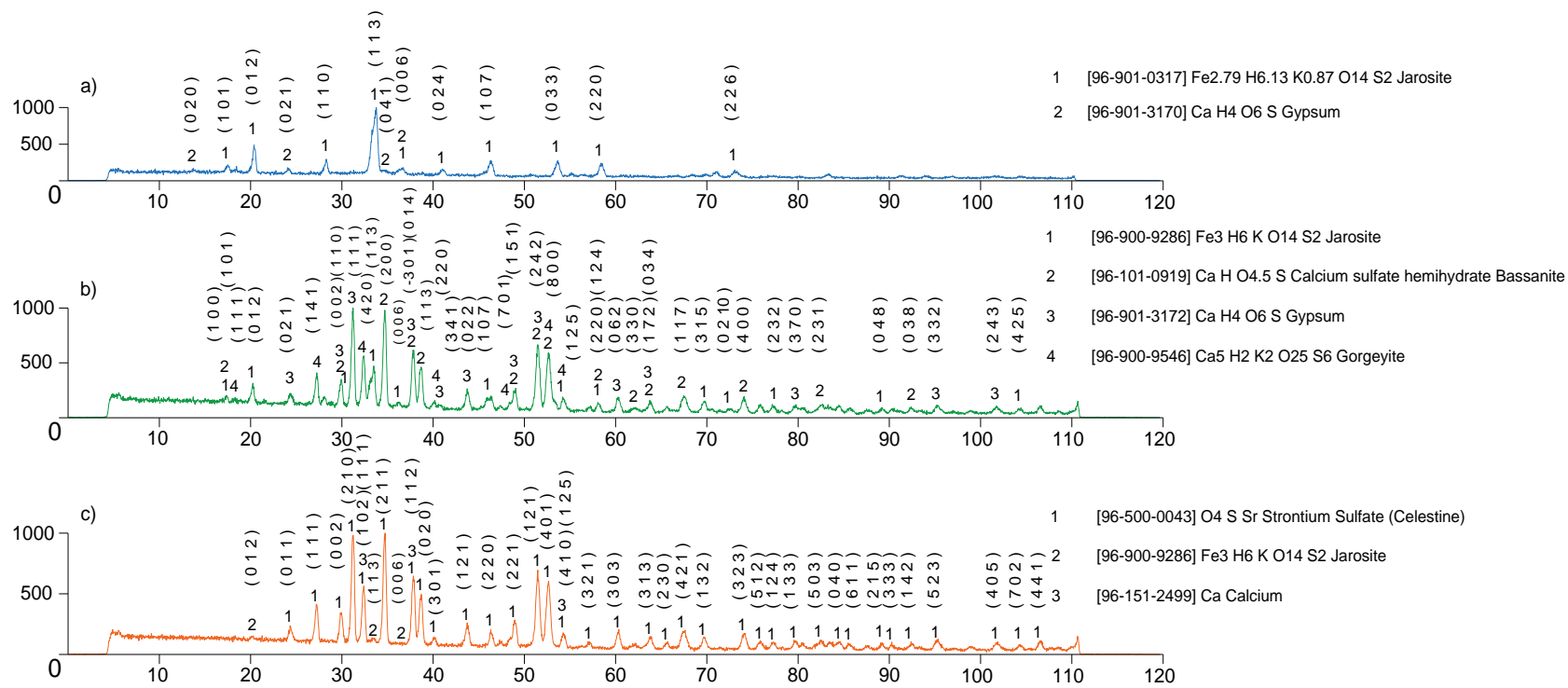


Figura 40. Espectros de difracción de rayos X para los compuestos tipo jarosita dopados: (a) JKCa; b) JKCa₂c) JKAl.

Para el caso de JKAlI (Figura 40c), muestra el espectro de difracción de rayos X donde se puede observar un espectro similar al mostrado en la Figura 8b. En este caso, la fase celestita del sulfato de estroncio se puede identificar como las fases correspondientes al sulfato de estroncio (celestita), probablemente debido a un intercambio entre los átomos de potasio y estroncio, teniendo más afinidad a reaccionar con el azufre. Por otro lado, se aprecian algunos picos correspondientes a la jarosita potásica, no tan intensos como en los espectros de las muestras pasadas, pero aún prevalece la formación de esta fase posiblemente por la incorporación del estroncio. En este caso, la XRD muestra un cambio en la estructura cristalina de trigonal a ortorrómbica, posiblemente debido a la mayor adición de elementos dopantes durante la síntesis. Por último, en el espectro no se alcanzan a apreciar las fases del magnesio que se hallaron en los ensayos anteriores, probablemente porque se encuentran superpuestos los picos de las fases anteriores.

4.3.1.1. Tamaño de cristal y porcentaje de cristalinidad

La determinación del tamaño de cristal se realizó con la ecuación Debye-Scherrer (fórmula 1).

$$(1) D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Donde D es el tamaño de la partícula, K se le conoce como la constante de Scherrer ($K=0.94$), λ es la longitud de onda de rayos X (para este estudio se usa cobalto 1.78900 \AA), β es el ancho completo a la mitad del máximo (FWHM) del pico de difracción y θ es el ángulo de Bragg. Los valores de β , así como el ancho FWHM de los picos se determinó utilizando un software de diseño AutoCad 2021 (figura 41).

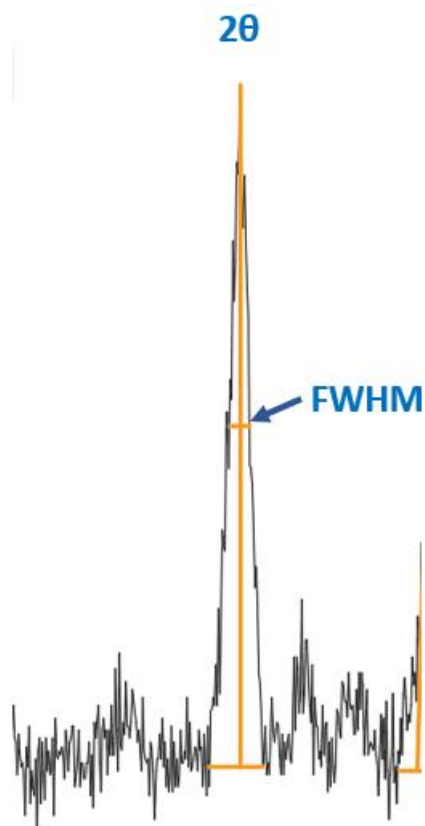


Figura 41. Determinación de los valores 2θ y $FWHM$ por software AutoCad 2021 para determinar tamaño de cristal.

Para poder determinar los datos de los picos del espectro, se utilizó el archivo de extensión “.xls” para poder extraer las coordenadas x y y. Posteriormente, se copian los valores al software AutoCad para crear una polilínea que dibuje el espectro de la muestra a elegir. Así, pico por pico se van obteniendo los valores de 2θ y del ancho de pico $FWHM$ para determinar el tamaño de cristal. El proceso se realiza a los picos pertenecientes a fases específicas previamente indexadas en el software Match 2.0.

4.3.1.1.1. Cristalinidad JKCa

En la tabla 5 se puede apreciar los tamaños de cristal de la muestra de jarosita de potasio dopada con calcio JKCa, en la cual se compone de dos fases: Jarosita de potasio y sulfato de calcio (ver figura 40). Se analizaron los picos pertenecientes a cada una de las dos fases, ordenándose de acuerdo al ángulo 2θ (de menor a mayor).

Tabla 5. Tamaños de cristal de JKCa.

Jarosita de Potasio dopada con calcio JKCa							
<i>Jarosita Fe_{2.79} H_{6.13} K_{0.87} O₁₄ S₂ [96-901-0317]</i>							
Pico	2θ	I	FHWM	θ	d (Å)	d Match (Å)	Tamaño cristal (Å)
1	17.560	25	0.284	8.780	5.860	5.943	5.990
2	18.476	10	0.070	9.238	5.572	5.732	24.340
3	20.404	44	0.350	10.202	5.050	5.099	4.880
4	28.328	22	0.306	14.164	3.656	3.557	5.670
5	33.783	100	0.432	16.892	3.078	3.083	4.070
6	41.057	9	0.248	20.529	2.551	2.545	7.240
7	46.303	24	0.536	23.152	2.275	2.839	3.410
8	53.673	31	0.465	26.837	1.981	1.981	4.050
9	58.396	27	0.511	29.198	1.834	1.828	3.770
10	71.094	9	0.345	35.547	1.539	1.541	5.990
11	73.085	12	0.125	36.543	1.502	1.486	16.750
12	83.357	7	0.186	41.679	1.345	1.344	12.110
<i>Yeso Ca H₄ O₆ S [96-901-3170]</i>							
Pico	2θ	I	FHWM	θ	d (Å)	d Match (Å)	Tamaño cristal (Å)
1	13.730	9	0.158	6.865	7.483	7.481	10.750
2	24.060	10	0.098	12.030	4.292	4.258	17.530
3	33.783	100	0.432	16.892	3.079	3.083	4.070
4	36.762	12	0.199	18.381	2.837	2.839	8.910
5	46.303	24	0.536	23.152	2.275	2.839	3.410

Para la muestra JKCa se realizó la comparativa de la distancia interplanar (d), entre este método utilizado y el software Match 2.0. Observándose que los resultados son bastante similares. Por otro lado, al realizar la comparativa del ancho de pico FHWM con respecto al mismo software, hay variaciones en las medidas debido a que no es un material puro o que contiene una sola fase. Por tal motivo, el tamaño de cristal va variando, ya sea por el traslape de picos causado por el desordenamiento de las direcciones de los planos o también por algún pico de una fase que logra coincidir con otro de fase diferente. Los tamaños de cristal obtenidos en la fase de jarosita, son variados, teniendo pequeños tamaños comprendidos entre 3 y 4 Å hasta cristales de tamaño que alcanzan los 20 Å. Mientras que, para la fase de sulfato de calcio se obtuvieron cristales desde los 3.41 Å hasta alcanzar casi los 20 Å.

El porcentaje de cristalinidad de las fases se presentan en la figura 42, donde se observa que prevalece mayoritariamente la fase de jarosita de potasio en la muestra de JKCa, con un 82% de cristalinidad contra un 18% de cristalinidad de la fase de yeso.

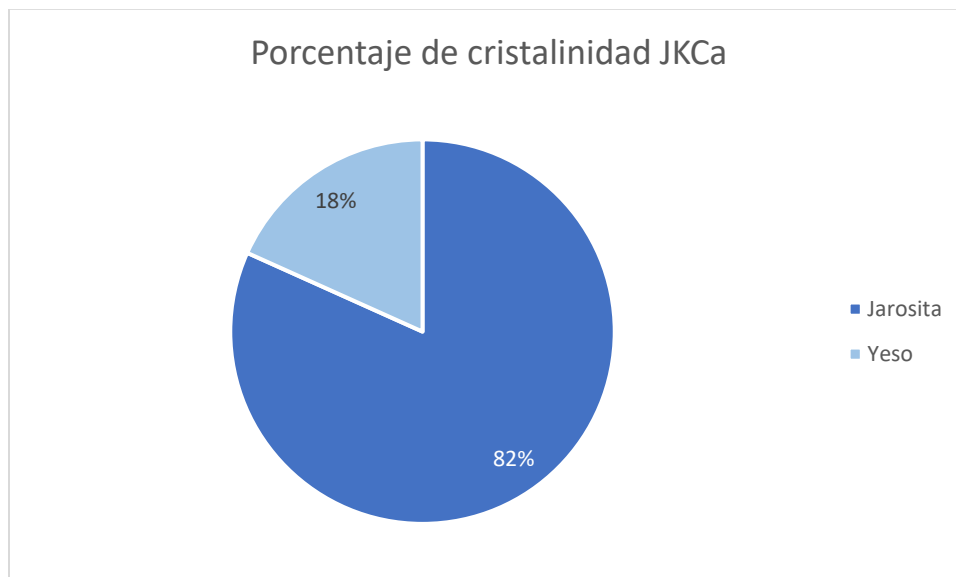


Figura 42. Porcentaje de cristalinidad JKCa.

4.3.1.1.2. Cristalinidad JKCa₂

Los resultados del tamaño de cristal para la muestra de jarosita de calcio dopada con calcio al doble de molaridad JKCa₂ se muestran en la tabla 6, donde podemos apreciar la presencia de 4 fases cristalinas (figura 40). Una fase corresponde a la jarosita de potasio, mientras que las otras 3 contienen variantes que contienen calcio como son el sulfato de calcio hemihidrato Bassanita, el yeso y la Gorgeyita. Se analizaron los picos pertenecientes a cada una de las cuatro fases, ordenándose de acuerdo al ángulo 2θ (de menor a mayor).

Tabla 6. Tamaños de cristal JKCa2.

Jarosita de Potasio dopada con calcio JKCa2													
<i>Jarosita Fe3 H6 K O14 S2 [96-900-9286]</i>						<i>Yeso Ca H4 O6 S [96-901-3172]</i>							
Pico	2θ	I	FHW	θ	d (Å)	Tamaño cristal (Å)	Pico	2θ	I	FHW	θ	d (Å)	Tamaño cristal (Å)
1	17.364	18	0.247	8.682	5.926	6.880	1	24.419	12	0.543	12.209	4.230	3.170
2	20.273	51	0.515	10.137	5.083	3.320	2	29.970	28	0.531	14.985	3.460	3.280
3	29.970	69	0.531	14.985	3.460	3.280	3	31.253	100	0.397	15.626	3.321	4.400
4	33.524	100	0.651	16.762	3.102	2.700	4	37.894	54	0.386	18.947	2.755	4.600
5	36.212	12	0.262	18.106	2.878	6.760	5	40.606	3	0.233	20.303	2.578	7.690
6	46.335	31	0.844	23.168	2.274	2.170	6	43.763	22	0.425	21.882	2.400	4.260
7	54.216	29	0.442	27.108	1.963	4.270	7	49.063	21	0.427	24.532	2.154	4.330
8	58.077	22	0.386	29.039	1.843	4.980	8	51.498	63	0.491	25.749	2.059	3.800
9	69.797	23	0.482	34.898	1.564	4.260	9	60.306	15	0.464	30.153	1.781	4.200
10	72.359	6	0.090	36.179	1.515	23.050	10	63.771	11	0.414	31.886	1.693	4.790
11	77.183	21	0.412	38.592	1.434	5.220	11	79.790	5	0.156	39.895	1.395	14.020
12	89.218	9	0.128	44.609	1.274	18.520	12	95.243	6	0.502	47.621	1.211	4.970
13	104.438	7	0.095	52.219	1.132	29.030	13	101.777	7	0.367	50.888	1.153	7.270
<i>Sulfato de calcio hemihidrato Bassanita Ca H O4.5 S [96-101-0919]</i>						<i>Gorgeyita Ca5 H2 K2 O25 S6 [96-900-9546]</i>							
Pico	2θ	I	FHW	θ	d (Å)	Tamaño cristal (Å)	Pico	2θ	I	FHW	θ	d (Å)	Tamaño cristal (Å)
1	17.364	8	0.247	8.682	5.926	6.880	1	18.312	10	0.155	9.156	5.621	11.020
2	29.970	29	0.531	14.985	3.460	3.280	2	27.286	41	0.354	13.643	3.792	4.890
3	34.723	100	0.408	17.362	2.998	4.320	3	32.454	82	0.348	16.227	3.201	5.030
4	37.894	56	0.386	18.947	2.755	4.600	4	40.219	13	0.185	20.109	2.602	9.670
5	38.702	39	0.404	19.351	2.700	4.410	5	49.063	38	0.427	24.532	2.154	4.330
6	49.063	22	0.427	24.532	2.154	4.330	6	52.650	100	0.524	26.325	2.017	3.580
7	51.498	65	0.491	25.749	2.059	3.800	7	54.216	21	0.442	27.108	1.963	4.270
8	52.650	58	0.524	26.325	2.017	3.580							
9	58.077	9	0.386	29.039	1.843	4.980							
10	62.183	5	0.454	31.091	1.732	4.320							
11	63.771	11	0.414	31.886	1.693	4.790							
12	67.484	17	0.651	33.742	1.610	3.110							
13	74.096	17	0.546	37.048	1.485	3.860							
14	82.732	6	0.397	41.366	1.354	5.640							
15	92.430	5	0.226	46.215	1.239	10.760							

Para la fase de Jarosita de potasio de la muestra JKCa2 los tamaños de cristal obtenidos son variados, teniendo pequeños cristales de tamaños cercanos a 2 Å y con una media entre 3 y 4 Å. También se encontraron cristales de mayor tamaño, llegando a tener valores cercanos a 30 Å. Probablemente esto se deba a la aglomeración y cubierta de las partículas de jarosita sobre los sulfatos de calcio. Por otro lado, para la fase de sulfato de calcio hemihidrato basanita se obtuvieron cristales cuyos tamaños son más constantes, entre 4 y 5 Å. En la fase de yeso se obtuvieron valores entre 3 y 7 Å, estando mejor definidos que en la muestra de JKCa posiblemente por estar en mayor concentración. Por último, para la fase de Gorgeyita se aprecian tamaños de cristal más variados, teniendo tamaños desde 2 Å hasta 11 Å.

El porcentaje de cristalinidad de las fases de JKCa2 se presentan en la figura 43, donde se aprecia una mayor cantidad de Sulfato de calcio en la fase Bassanita con un 40% de cristalinidad. La fase que le sigue es la de yeso con un 30% de cristalinidad. Mientras que, la fase jarosita aparece en menor porcentaje junto a la fase de Gorgeyita, la cual es un sulfato de calcio con potasio. Sin embargo, aún se encuentra presente probablemente por la cantidad de sulfato de calcio que reaccionó con los azufres y potasios de la solución. Ambas fases cuentan con un 15% de cristalinidad.

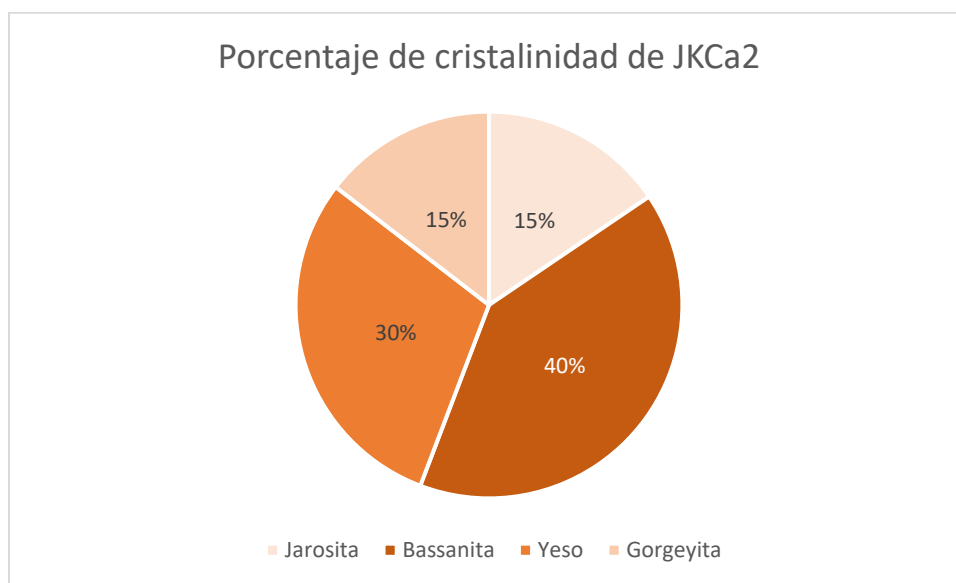


Figura 43. Porcentaje de cristalinidad JKCa2.

4.3.1.1.3. Cristalinidad JKAlI

Los resultados del tamaño de cristal para la muestra de jarosita de calcio dopada con calcio, estroncio y magnesio JKAlI se muestran en la tabla 7, donde podemos apreciar la presencia de 3 fases cristalinas (figura 40). Teniendo una fase de sulfato de estroncio (celestina), una de jarosita de potasio y otra de calcio. Se analizaron los picos pertenecientes a cada una de las tres fases, ordenándose de acuerdo al ángulo 2θ (de menor a mayor).

Tabla 7. Tamaños de cristal JKAlI.

Jarosita de Potasio dopada con calcio, estroncio y magnesio JKAlI													
<i>Sulfato de estroncio (Celestina) O4 S Sr [95-500-0043]</i>							<i>Jarosita Fe3 H6 K O14 S2 [96-900-9286]</i>						
Pico	2θ	I	FHW	θ	d (Å)	Tamaño cristal (Å)	Pico	2θ	I	FHW	θ	d (Å)	Tamaño cristal (Å)
1	24.354	14	0.372	12.177	4.241	4.630	1	20.306	3	0.148	10.153	5.074	11.570
2	27.221	35	0.374	13.611	3.801	4.630	2	33.362	4	0.271	16.681	3.116	6.470
3	29.953	27	0.405	14.977	3.461	4.300	3	34.755	100	0.393	17.378	2.995	4.480
4	31.253	97	0.382	15.626	3.321	4.570	4	35.889	3	0.095	17.944	2.903	18.660
5	32.421	51	0.393	16.211	3.204	4.450	5	54.280	14	0.485	27.140	1.961	3.890
6	34.755	100	0.393	17.378	2.995	4.480	6	57.184	6	0.234	28.592	1.869	8.190
7	37.861	62	0.396	18.931	2.757	4.490	<i>Calcio Ca [96-151-2499]</i>						
8	38.734	45	0.426	19.367	2.697	4.180	Pico	2θ	I	FHW	θ	d (Å)	Tamaño cristal (Å)
9	40.090	7	0.355	20.045	2.610	5.040	1	32.421	82	0.393	16.211	3.204	4.450
10	43.763	20	0.377	21.882	2.400	4.810	2	37.861	100	0.396	18.931	2.757	4.490
11	46.335	14	0.360	23.168	2.274	5.090	3	54.280	22	0.485	27.140	1.961	3.890
12	48.967	25	0.470	24.484	2.158	3.930	4	65.740	10	0.376	32.870	1.648	5.320
13	51.498	66	0.474	25.749	2.059	3.940	5	67.643	23	0.666	33.821	1.607	3.040
14	52.682	56	0.513	26.341	2.016	3.660	6	92.400	10	0.237	46.200	1.239	10.240
15	54.280	14	0.485	27.140	1.961	3.890							
16	57.184	6	0.234	28.592	1.869	8.190							
17	60.370	17	0.389	30.185	1.779	5.010							
18	63.867	11	0.490	31.933	1.691	4.040							
19	65.740	6	0.376	32.870	1.648	5.320							
20	67.643	14	0.666	33.821	1.607	3.040							
21	69.686	10	0.479	34.843	1.566	4.270							
22	74.222	14	0.608	37.111	1.483	3.470							
23	75.892	8	0.525	37.946	1.455	4.060							
24	77.277	6	0.523	38.639	1.433	4.110							
25	79.570	7	0.316	39.785	1.398	6.930							
26	82.514	6	0.242	41.257	1.357	9.240							
27	83.450	5	0.137	41.725	1.344	16.450							
28	84.479	6	0.428	42.240	1.331	5.300							

29	89.095	6	0.292	44.547	1.275	8.090
30	90.293	7	0.132	45.146	1.262	18.040
31	92.400	6	0.237	46.200	1.239	10.240
32	95.363	9	0.438	47.682	1.210	5.710
33	101.895	7	0.540	50.948	1.152	4.940
34	104.320	5	0.316	52.160	1.133	8.660
35	106.533	9	0.482	53.267	1.116	5.840

Para la fase de sulfato de estroncio (Celestina) de la muestra JKAll los tamaños de cristal obtenidos son constantes y no varían demasiado, teniendo una media que oscila entre 3 y 5 Å, aunque teniendo cristales de tamaños mayores llegando a 18 Å. Por otro lado, para la fase de jarosita se obtuvieron cristales de tamaños más variados, teniendo cristales desde 4 Å, hasta tamaños de 18 Å. Por último, en la fase de calcio prevalecen tamaños de cristal entre 3 y 5 Å.

El porcentaje de cristalinidad de las fases se presentan en la figura 44, donde se observa que la fase de sulfato de estroncio (Celestina) es la que se presenta mayormente en la muestra de JKAll, con un 77% de cristalinidad contra un 12% de cristalinidad de la fase de calcio. Finalmente tenemos la fase de jarosita con un 11% de cristalinidad que aún prevalece en la muestra. Podemos asumir que, al incorporar elementos dopantes durante la síntesis de jarosita, ésta termina por ir desapareciendo conforme van aumentando los dopantes.

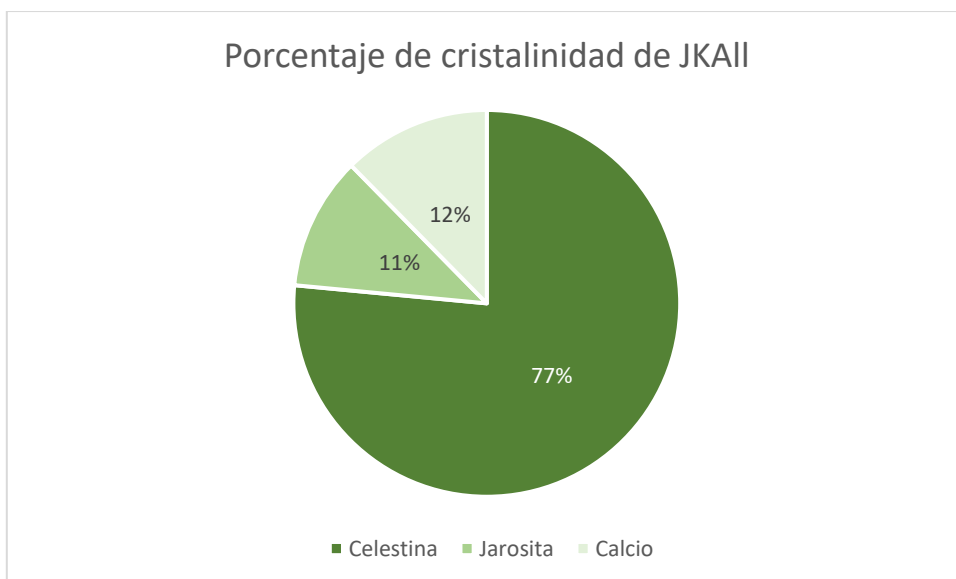


Figura 44. Porcentaje de cristalinidad JKAll.

En la Figura 45a, se muestra la estructura cristalina de la jarosita de potasio (sin dopaje), donde se pueden ver células unitarias trigonales formando estructuras hexagonales compactas. Por otro lado, la Figura 45b es una jarosita de potasio dopada con Ca, donde se sugiere que la migración de iones alcalinos en las estructuras de JKCa es posible a altas temperaturas o se acompaña de una reorganización estructural (Kosova et al., 2020). Lo anterior es consistente con la ocurrencia de la transformación cristalino-amorfa cuando se inserta un ion alcalino en la estructura. También se puede observar que la intercalación de iones Ca durante la primera descarga se produce mediante un mecanismo bifásico con la formación de la fase correspondiente (Gnanavel et al., 2014), obteniendo una solución sólida de JKCa modificando la celda unitaria y obteniendo una combinación entre tetragonal y fases ortorrómbicas.

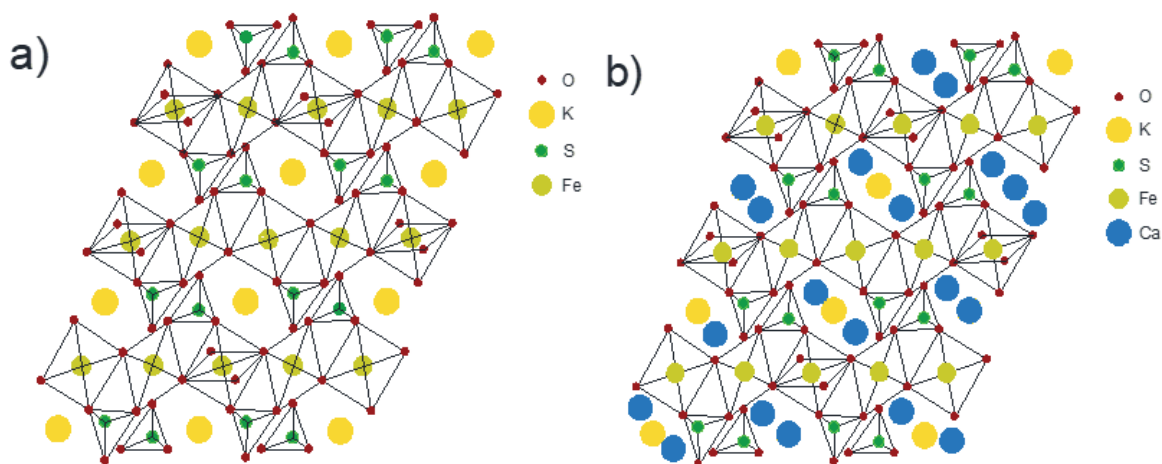


Figura 45. Representación de la estructura cristalina de a) la jarosita potásica, y b) la jarosita potásica dopada con Ca

4.4. Ensayos biológicos de las jarositas

4.4.1. Ensayo MTT

Los resultados de citotoxicidad celular por ensayos MTT se muestran en la Figura 46. La viabilidad celular aumentó significativamente con el tiempo tanto en el grupo de control como en el de jarosita. En el día 3, la unidad de actividad metabólica de absorbancia más alta se encontraba en las células en contacto con JKAlI (23,63 % +/- 1,27 %) y JKCa₂ (17,83 % +/- 2,17 %). La unidad de absorbancia más baja de la actividad metabólica se encontraba en las células en contacto con JKCa (16,23 % +/- 2,44 %). En el día 7, la mayor actividad metabólica fue la de las células en contacto con JKAlI (38,03 % +/- 4,38 %), seguida de las células en contacto con JKCa₂ (36,27 % +/- 5,37 %). De nuevo, la unidad de absorbancia más baja de la actividad metabólica se encontraba en las células en contacto con JKCa (29,60 % +/- 2,84 %). Finalmente, el día 10, las actividades metabólicas no aumentaron mucho, siendo menos de 50 unidades de absorbancia en las tres muestras de jarosita en comparación con el grupo control (72,53 +/- 3,57), JKa₂ (45,03% +/- 5,1%), JKAlI (40,53% +/- 6,81%) y JKCa (35,57% +/- 7,1). Las condiciones de cultivo adversas, como la diferencia en el pH o el agotamiento de nutrientes esenciales, como la glucosa, pueden provocar variaciones en los resultados

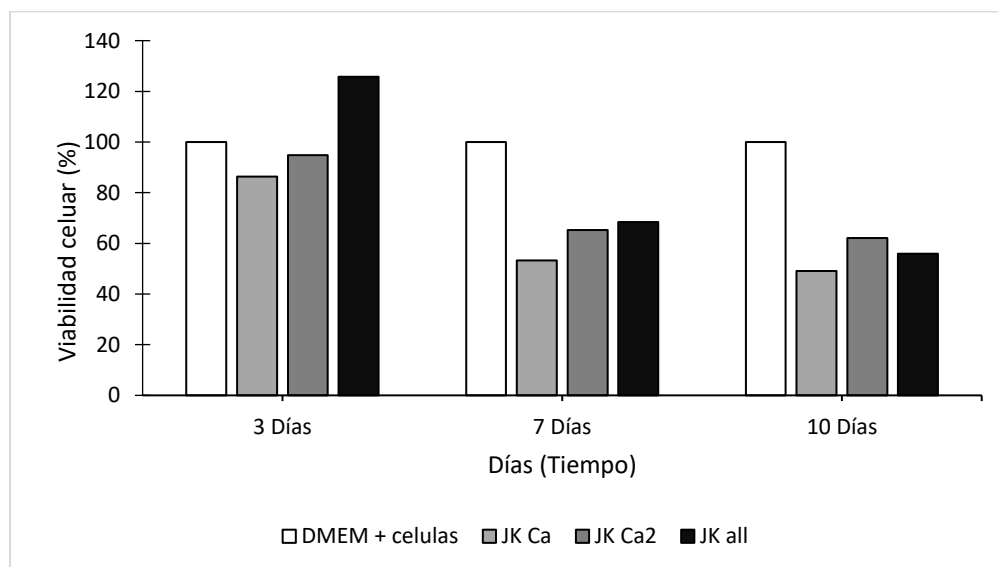


Figura 46. Ensayo de citotoxicidad (MTT) de células troncales de pulpa dental porcina sembradas (4000 células/pocillo) con polvos de jarosita después de 3, 7 y 10 días. Los resultados se expresan como la media y la desviación estándar de la viabilidad celular.

Los cambios en la citotoxicidad relativa entre las células troncales de pulpa dental porcina cultivadas con JKCa, JKCa2, JKAll y en el grupo control (sin presencia de jarosita). Después del día 3, JKCa tuvo una viabilidad y proliferación celular por debajo de JKCa2 y JKAll en los tres tiempos evaluados, pero al comparar JKCa2 y JKAll ambas tuvieron un comportamiento muy similar en los días 7 y 10, mostrando células viables y proliferación celular aumentada como se muestra (Figura 45) por el metabolismo de las células, según ISO 10993-Parte 5 (ISO, 2022). Es posible que si hubiéramos evaluado en tiempos más largos los polvos de JKCa y JKAll, por ejemplo, a los 14 o 21 días, se superaría el 50% de viabilidad y proliferación, ya que se expresa en casi el doble del porcentaje aumentado del día 3 al día 10 en JKCa2, y JKAll, como se determinó en otros estudios donde la presencia de Sr podría mejorar la viabilidad celular, diferenciación osteogénica y angiogénica (Wang et al., 2017), y excelente bioactividad para la regeneración ósea además de una excelente resistencia a la corrosión (Pham et al., 2022).

4.4.2. Diferenciación osteogénica

La tinción con rojo de alizarina se puede utilizar como indicador de la diferenciación osteogénica (Rosales et al., 2021). Para evaluar la propiedad osteoinductiva de los polvos de jarosita, hemos elegido aquellos que mostraron mejor viabilidad y proliferación (JKCa2, JKAll) con el ensayo MTT. Después de sembrar las células troncales de pulpa dental porcina en una placa de 24 pocillos, se añadieron 10 mm³ de polvo de jarosita (grupo b, c y e). La Figura 47b muestra algunos depósitos de calcio que se pueden observar en las células sembradas en el DMEM bajo en glucosa JKCa2+ (Bio-west, Ciudad de México), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) (Bio-west, Ciudad de México).) y penicilina estreptomomicina al 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Puede observarse más evidencia del depósito de calcio en las células sembradas en el pozo de diferenciación osteogénica JKCa2 + MesenCultTM (Figura 47c); se puede observar mucha deposición de calcio en las células sembradas en el pocillo de JKAll + DMEM bajo en glucosa (Bio-west, Ciudad de México), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) (Bio-west, México) y penicilina-estreptomomicina al 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) (Figura 47d); pero se puede observar un rojo intenso de depósito de calcio en las células sembradas en el pozo de diferenciación osteogénica JKAll + MesenCultTM

(Figura 47e); y finalmente, no se observa evidencia de depósito de calcio en el grupo control (Figura 47a).

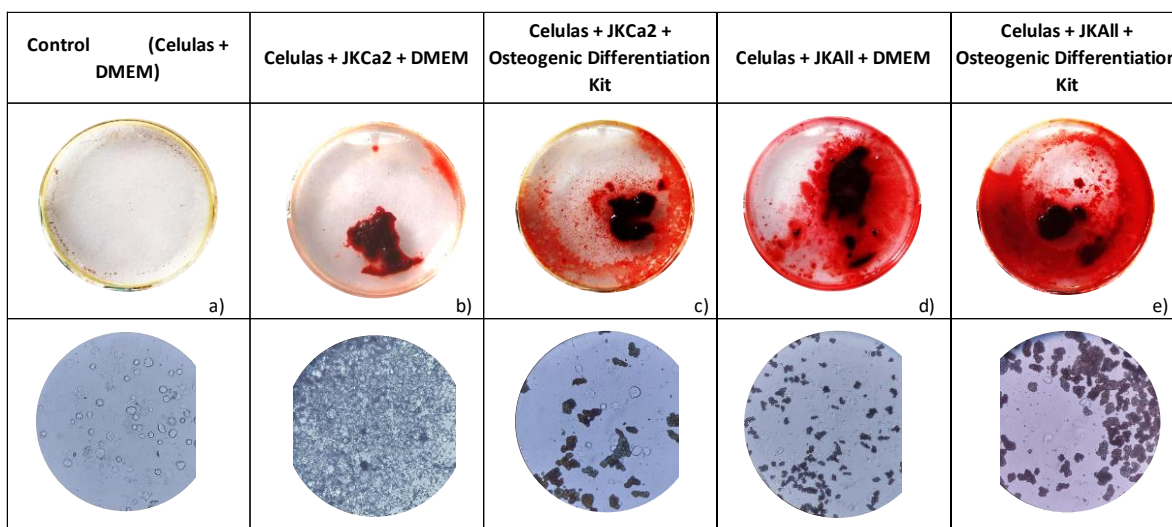


Figura 47. Imágenes representativas del depósito mineral en células troncales de pulpa dental porcina el día 21 por ARS, con sus respectivas micrografías: (a) control (células y DMEM); (b) células, JKCa2 y DMEM; (c) células, JKCa2 y kit de diferenciación osteogénica; (d) células, JKAll y DMEM; (e) células, JKAll y kit de diferenciación osteogénica.

Otra explicación que se puede visualizar es agregar menos cantidad de polvo sobre las células para permitir una mejor estabilidad del cultivo celular, y podrían migrar al fondo de la placa permitiendo así que vivan más células y mayor proliferación como se muestra en el grupo de control sin polvo de jarosita. Este estudio es único en el sentido de que investigó exclusivamente los efectos dependientes de una dosis única (Wang et al., 2015) del polvo de jarosita colocado en células troncales de pulpa dental porcina, observando específicamente la viabilidad y proliferación celular. En ese sentido, la composición de JKCa2 permitió la osteoinducción cuando se añadió a las células troncales de pulpa dental porcina. Se observó poca coloración el día 28, a excepción de la composición de JKAll que se muestra y aumentó en rojo intenso cubriendo casi toda la superficie del pozo, lo que muestra que la composición de JKAll muestra no solo proliferación de células, por ejemplo, cuando se cultivaron solo con DMEM, lo que se evidencia por la presencia de calcio, estroncio y magnesio para demostrar buenas propiedades osteoinductivas.

Posteriormente se realizaron ensayos con diferentes cantidades para cada una de las muestras para determinar si una cantidad menor de polvo permite mayor estabilidad del cultivo celular. En la figura 48 podemos apreciar los ensayos de tinción con rojo de alizarina realizados a diferentes cantidades de polvo JKCa2 donde se observa lo siguiente.

El grupo B muestra una buena tinción, sobre todo cerca de donde se encuentra depositado el polvo de JKCa2 y en el fondo del pocillo. Por otro lado, en el grupo C con la misma cantidad de JKCa2 se observa una pigmentación más saturada, probablemente debida a la presencia del medio osteoinductor. Posteriormente, en los grupos D, F y H que no contienen medio osteoinductor, se observa un color rojo parecido, dejándose de apreciar el fondo y las células al aumentar la cantidad de material. Para el resto de los grupos E, G e I, la tinción prevalece ligeramente más oscura, dejando de apreciar detalles del fondo y células por la presencia de material JKCa2

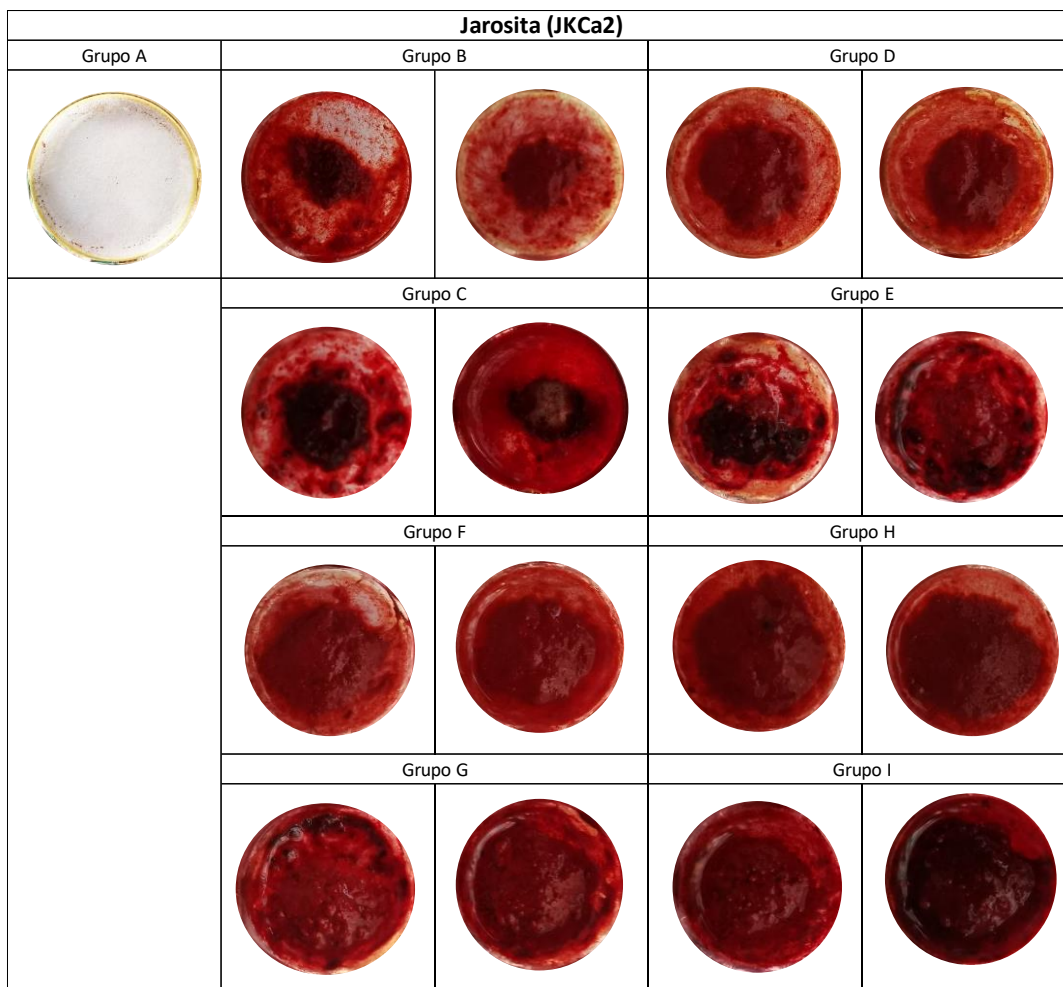


Figura 48. Imágenes representativas del depósito mineral en células troncales de folículo dental humano el día 28 por ARS: (Grupo A) control (células y DMEM); (Grupo B) células, JKCa2 (1.5 mm³) y DMEM; (Grupo C) células, JKCa2 (1.5 mm³) y kit de diferenciación osteogénica; (Grupo D) células, JKCa2 (3.0 mm³) y DMEM; (Grupo E) células, JKCa2 (3.0 mm³) y kit de diferenciación osteogénica; (Grupo F) células, JKCa2 (4.5 mm³) y DMEM; (Grupo G) células, JKCa2 (4.5 mm³) y kit de diferenciación osteogénica; (Grupo H) células, JKCa2 (6.0 mm³) y DMEM; (Grupo I) células, JKCa2 (6.0 mm³) y kit de diferenciación osteogénica.

En la figura 49 se aprecian los ensayos para la muestra de JKAll, observando una tinción en el grupo B (Células, DMEM y JKAll) bastante similar al grupo C (Células, JKAll y medio de diferenciación osteogénica) indicando que la muestra JKAll con tan solo 1.5 mm³ de polvo logra formar depósitos cálcicos en las células troncales de folículo dental humano, tiñendo de un color rojo tanto la muestra JKAll como el fondo del pozo donde quedaron depositadas las células. Conforme aumentamos la cantidad de material en los grupos donde no hay medio osteoinductor (D, F, H) el fondo del pocillo queda repleto de este, oscureciendo la muestra y no dejando apreciar detalles en el fondo. Para el resto de los

grupos con medio osteoinductor (E, G, I) la apreciación es similar, no dejando ver el fondo por la cantidad de material. Sin embargo, la intensidad del color es muy parecida en cada par de grupos que contienen las mismas cantidades de polvo. Demostrando mejores resultados osteoinductores que la muestra de JKCa2.

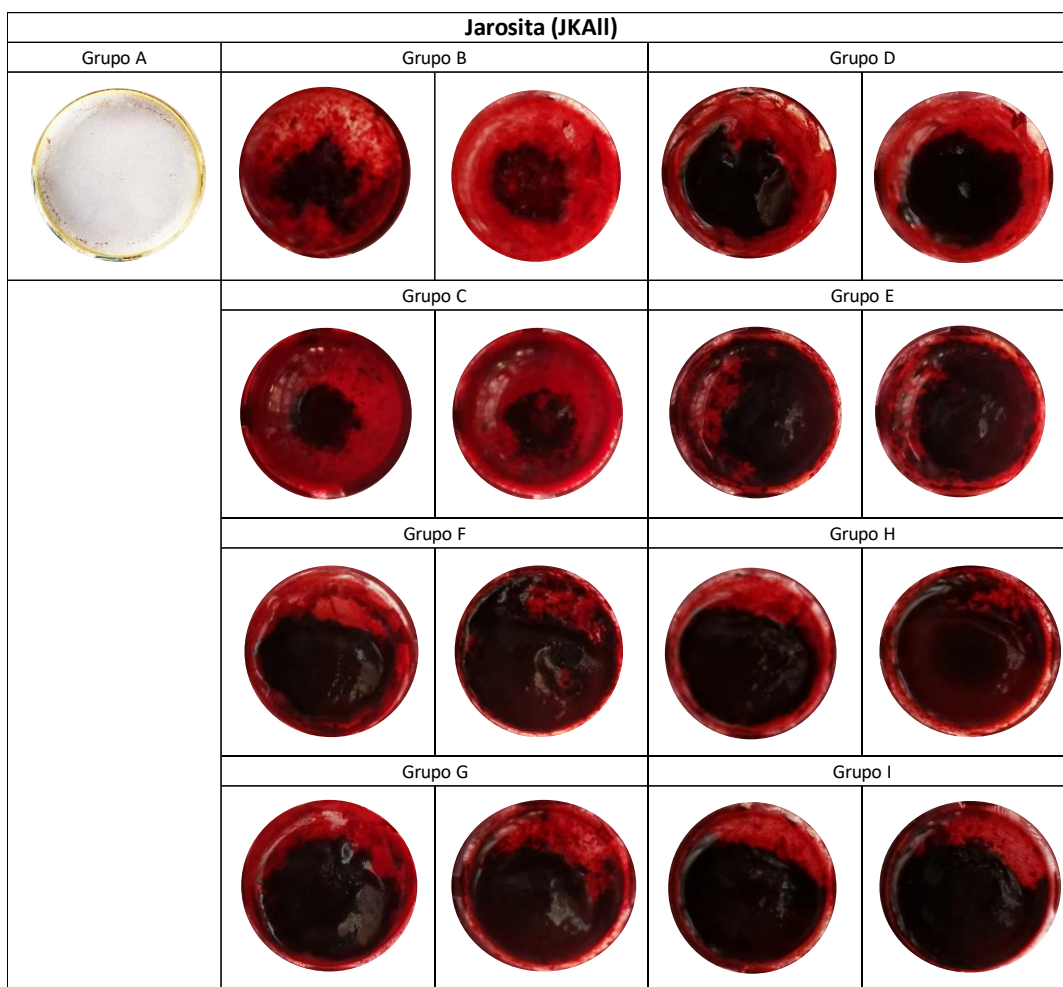


Figura 49. Imágenes representativas del depósito mineral en células troncales de folículo dental humano el día 28 por ARS: (Grupo A) control (células y DMEM); (Grupo B) células, JKAll (1.5 mm³) y DMEM; (Grupo C) células, JKAll (1.5 mm³) y kit de diferenciación osteogénica; (Grupo D) células, JKAll (3.0 mm³) y DMEM; (Grupo E) células, JKAll (3.0 mm³) y kit de diferenciación osteogénica; (Grupo F) células, JKAll (4.5 mm³) y DMEM; (Grupo G) células, JKAll (4.5 mm³) y kit de diferenciación osteogénica; (Grupo H) células, JKAll (6.0 mm³) y DMEM; (Grupo I) células, JKAll (6.0 mm³) y kit de diferenciación osteogénica.

5. CONCLUSIONES

Los compuestos jarosíticos de potasio pueden ser dopados con otros elementos (Ca, Sr, Mg) en la mejora de sus propiedades, abriendo nuevas líneas de investigación para estos materiales y ampliando su horizonte de aplicación. Particularmente en este estudio en la Ingeniería de tejidos óseos.

Las jarositas de potasio dopadas con calcio JKCa, con calcio al doble de molaridad JKCa₂ y dopadas con Calcio, Estroncio y Magnesio JKAlI, son viables para su uso en la ingeniería tisular ósea desde el punto de vista biológico, debido a que no son tóxicos para las células troncales de pulpa dental porcina, dados los resultados de los ensayos de citotoxicidad MTT.

Principalmente las muestras de JKCa₂ y JKAlI presentan probablemente propiedades osteoinductoras dados los resultados de la prueba de Rojo de Alizarina lo que conlleva a continuar la investigación. Estableciendo nuevos ensayos para corroborar la inducción a linaje osteogénico.

Se necesitan más estudios para determinar su uso como un material osteogénico para su empleo en la medicina regenerativa a través de ensayos invitro como ALP, RunX2, Osteocalcina. Así como su incorporación en andamios para la realización de ensayos in vivo.

6. REFERENCIAS

1. Dutrizac, J. E., & Kaiman, S. (1976). Synthesis and properties of jarosite-type compounds. *The Canadian Mineralogist*, 14(2), 151-158.
2. Das, G. K., Anand, S., Acharya, S., & Das, R. P. (1995). Preparation and decomposition of ammoniojarosite at elevated temperatures in $\text{H}_2\text{O} \square (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \square \text{H}_2\text{SO}_4$ media. *Hydrometallurgy*, 38(3), 263-276.
3. Drouet, C., & Navrotsky, A. (2003). Synthesis, characterization, and thermochemistry of K-Na-H₃O jarosites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67(11), 2063-2076.
4. Smith, A. M., Hudson-Edwards, K. A., Dubbin, W. E., & Wright, K. (2006). Dissolution of jarosite $[\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6]$ at pH 2 and 8: Insights from batch experiments and computational modelling. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(3), 608-621.
5. Dutrizac, J. E. (2004). The behaviour of the rare earths during the precipitation of sodium, potassium and lead jarosites. *Hydrometallurgy*, 73(1-2), 11-30.
6. Jarosites Crystals. Available online: <https://www.mindat.org/photo-411652.html> (accessed on 31 May 2022).
7. Hernández-Lazcano, E., Cerecedo-Sáenz, E., Hernández-Ávila, J., Toro, N., Karthik, T. V. K., Mendoza-Anaya, D., ... & Salinas-Rodríguez, E. (2021). Synthesis of hydronium-potassium jarosites: the effect of pH and aging time on their structural, morphological, and electrical properties. *Minerals*, 11(1), 80.
8. Long, D. T., Fegan, N. E., McKee, J. D., Lyons, W. B., Hines, M. E., & Macumber, P. G. (1992). Formation of alunite, jarosite and hydrous iron oxides in a hypersaline system: Lake Tyrrell, Victoria, Australia. *Chemical Geology*, 96(1-2), 183-202.
9. Battler, M. M., Osinski, G. R., Lim, D. S., Davila, A. F., Michel, F. A., Craig, M. A., ... & Banerjee, N. R. (2013). Characterization of the acidic cold seep emplaced jarositic Golden Deposit, NWT, Canada, as an analogue for jarosite deposition on Mars. *Icarus*, 224(2), 382-398.

10. Varekamp, J. C., Pasternack, G. B., & Rowe Jr, G. L. (2000). Volcanic lake systematics II. Chemical constraints. *Journal of volcanology and geothermal research*, 97(1-4), 161-179.
11. Zolotov, M. Y., & Shock, E. L. (2005). Formation of jarosite-bearing deposits through aqueous oxidation of pyrite at Meridiani Planum, Mars. *Geophysical Research Letters*, 32(21).
12. Dutrizac, J. E., & Jambor, J. L. (2000). Jarosites and their application in hydrometallurgy. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 40(1), 405-452.
13. Salinas, E., Roca, A., Cruells, M., Patiño, F., & Córdoba, D. A. (2001). Characterization and alkaline decomposition–cyanidation kinetics of industrial ammonium jarosite in NaOH media. *Hydrometallurgy*, 60(3), 237-246.
14. Xue, P. Y., Ju, S. H., Zhang, Y. F., & Wang, X. W. (2011). Recovery of valuable metals by leaching of roasted jarosite residue. *Chin. J. Process Eng*, 11(1), 56-60.
15. Salinas, E.; Cerecedo, E.; Ramírez, M.; Patiño, F.; Pérez, M. Kinetics of alkaline decomposition and cyanidation of argentinian rubidium jarosite in NaOH medium. *Metall. Mater. Trans. B* 2012, 43B, 1027–1033. [CrossRef]
16. Perez-Labra, M., Romero-Serrano, A., Salinas-Rodriguez, E., Avila-Davila, E. O., & Reyes-Perez, M. (2012). Synthesis, thermo chemistry and kinetics of alkaline decomposition of rubidium jarosite in Ca (OH) 2 media. *Metall. Mater. Trans. B*, 43, 773-780.
17. Xu, W., Xie, Z., Cui, X., Zhao, K., Zhang, L., Mai, L., & Wang, Y. (2016). Direct growth of an economic green energy storage material: a monocrystalline jarosite-KFe₃(SO₄)₂(OH)₆-nanoplates@ rGO hybrid as a superior lithium-ion battery cathode. *Journal of Materials Chemistry A*, 4(10), 3735-3742.
18. Kosova, N. V., Shindrov, A. A., & Kabanov, A. A. (2020). Theoretical and experimental study of reversible intercalation of Li ions in the Jarosite NaFe₃(SO₄)₂(OH)₆ structure. *Electrochimica Acta*, 359, 136950.

19. Chen, Z., Liu, H., Liu, X., & Cui, F. Z. (2011). Injectable calcium sulfate/mineralized collagen-based bone repair materials with regulable self-setting properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 99(4), 554-563.

[A] M.V. Thomas, D.A. Puleo, *J Biomed. Mater. Res.* 88B (2009) 597–610

20. Sidqui, M., Collin, P., Vitte, C., & Forest, N. (1995). Osteoblast adherence and resorption activity of isolated osteoclasts on calcium sulphate hemihydrate. *Biomaterials*, 16(17), 1327-1332.

21. Rosales Ibáñez, R., Alvarado Estrada, K. N., & Ojeda Gutiérrez, F. (2012). Ingeniería tisular en Odontología. *Revista ADM [internet]*. Julio-agosto, 164-67.

22. Lu, Z., Wang, G., Roohani-Esfahani, I., Dunstan, C. R., & Zreiqat, H. (2014). Baghdadite ceramics modulate the cross talk between human adipose stem cells and osteoblasts for bone regeneration. *Tissue Engineering Part A*, 20(5-6), 992-1002.

23. Ramaswamy, Y., Wu, C., Van Hummel, A., Combes, V., Grau, G., & Zreiqat, H. (2008). The responses of osteoblasts, osteoclasts and endothelial cells to zirconium modified calcium-silicate-based ceramic. *Biomaterials*, 29(33), 4392-4402.

24. Haimi, S., Moimas, L., Pirhonen, E., Lindroos, B., Huhtala, H., Rätty, S., ... & Suuronen, R. (2009). Calcium phosphate surface treatment of bioactive glass causes a delay in early osteogenic differentiation of adipose stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 91(2), 540-547.

25. Mohan, B. G., Suresh Babu, S., Varma, H. K., & John, A. (2013). In vitro evaluation of bioactive strontium-based ceramic with rabbit adipose-derived stem cells for bone tissue regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(12), 2831-2844.

26. Yang, F., Yang, D., Tu, J., Zheng, Q., Cai, L., & Wang, L. (2011). Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling. *Stem cells*, 29(6), 981-991.

27. Azevedo, H. S., & Mata, A. (2022). Embracing complexity in biomaterials design. *Biomaterials and Biosystems*, 6, 100039.
28. Meerloo, J. V., Kaspers, G. J., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer cell culture* (pp. 237-245). Humana Press.
29. PUCHTLER, H., Meloan, S. N., & TERRY, M. S. (1969). On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 17(2), 110-124.
30. Rosales-Ibáñez, R., Cubo-Mateo, N., Rodríguez-Navarrete, A., González-González, A. M., Villamar-Duque, T. E., Flores-Sánchez, L. O., & Rodríguez-Lorenzo, L. M. (2021). Assessment of a PCL-3D printing-dental pulp stem cells triplet for bone engineering: An in vitro study. *Polymers*, 13(7), 1154.
31. Anderson, J.M.; Voskerician, G. (2010) The challenge of biocompatibility evaluation of Biocomposites. In *Biomedical Composites*, 1st ed.; Ambrosio. L., Ed.; Woodhead Publishing: Sawston. UK; pp. 325–352. ISBN 9781845694364.
32. Settle, F.A. (Ed.) (1997) *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, 1st ed.; Prentice-Hall, Inc.: Upper Saddle River, NJ, USA; pp. 1–728.
33. Kamaraj, C., Lakshmi, S., Rose, C., & Muralidharan, C. (2017). Wet blue fiber and lime from leather industry solid waste as stabilizing additive and filler in design of stone matrix asphalt. *Asian Journal of Research in Social Sciences and Humanities*, 7(11), 240-257.
34. Chemical Book—Strontium Sulfate. Available online: https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_7759-02-6_IR1.htm (accessed on 6 June 2022).
35. Bishop, J.L.; Murad, E. The visible and infrared spectral properties of jarosite and alunite. *Am. Mineral.* 2005, 90, 1100–1107. [CrossRef]
36. Lane, M. D., & Christensen, P. R. (1998). Thermal infrared emission spectroscopy of salt minerals predicted for Mars. *Icarus*, 135(2), 528-536.

37. Vassallo, A. M., & Finnie, K. S. (1992). Infrared emission spectroscopy of some sulfate minerals. *Applied Spectroscopy*, 46(10), 1477-1482.
38. Herzberg, G., & Crawford Jr, B. L. (1946). Infrared and Raman spectra of polyatomic molecules. *The Journal of Physical Chemistry*, 50(3), 288-288.
39. Chemical Book—Magnesium Sulfate Heptahydrate. Available online: https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_10034-99-8_IR1.htm (accessed on 6 June 2022).
40. Gnanavel, M., Pralong, V., Lebedev, O. I., Caignaert, V., Bazin, P., & Raveau, B. (2014). Lithium intercalation into the jarosite-type hydroxysulfate: a topotactic reversible reaction from a crystalline phase to an inorganic polymer-like structure. *Chemistry of Materials*, 26(15), 4521-4527.
41. ISO. Part 5—Use of International Standard ISO 10993-1, “Biological Evaluation of Medical Devices—Part 1: Evaluation and Testing within a Risk Management Process”. Available online: <https://www.fda.gov/media/85865/download> (accessed on 26 April 2022).
42. Wang, G., Roohani-Esfahani, S. I., Zhang, W., Lv, K., Yang, G., Ding, X., ... & Jiang, X. (2017). Effects of Sr-HT-Gahnite on osteogenesis and angiogenesis by adipose derived stem cells for critical-sized calvarial defect repair. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
43. Pham, D. Q., Gangadoo, S., Lu, Z., Berndt, C. C., Newsom, E. T., Zreiqat, H., ... & Ang, A. S. M. (2022). Strontium-doped hardystonite plasma sprayed coatings with robust antimicrobial activity. *Materials Today Chemistry*, 24, 100822.
44. Wang, J., Witte, F., Xi, T., Zheng, Y., Yang, K., Yang, Y., ... & Qin, L. (2015). Recommendation for modifying current cytotoxicity testing standards for biodegradable magnesium-based materials. *Acta biomaterialia*, 21, 237-249.
45. Jun PENG, Yang-jin WEI, Mei-qing SHI, Jia-hui WU, Qing-wei WANG, Zhang LIN, Hui LIU, Xu YAN. (2022) Spontaneous separation of Pb from PbSO₄-coprecipitated jarosite using freeze-thaw cycling with thiourea, *Transactions of Nonferrous Metals Society*

of China, Volume 32, Issue 3, Pages 1019-1030, ISSN 1003-6326, [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(22\)65851-5](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(22)65851-5).

Slack, J. M. W. (2008). Origin of stem cells in organogenesis. *Science*, 322(5907), 1498-1501.

Caplan AI: Bone development. In: Wiley J, ed. *Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues*. Chichester, CIBA Foundation Symposium 136. 1988:3-21.

Nagels J, Stokdijk M, Rozing PM. Stress shielding and bone resorption in shoulder arthroplasty. *J Shoulder Elbow Surg* 2003; 12:35–39.

Yang F, Yang D, Tu J, Zheng Q, Cai L, Wang L. Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling. *Stem cells* 2011;29(6):981–991.

Ni GX, Chiu KY, Lu WW et al. Strontium-containing hydroxyapatite bioactive bone cement in revision hip arthroplasty. *Biomaterials* 2006; 27:4348–4355.

Shimojo, A.A.M., Rodrigues, I.C.P., Perez, A.G.M., Souto, E.M.B., Gabriel, L.P., Webster, T. (2020). Scaffolds for Tissue Engineering: A State-of-the-Art Review Concerning Types, Properties, Materials, Processing, and Characterization. In: Li, B., Moriarty, T., Webster, T., Xing, M. (eds) *Racing for the Surface*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-34471-9_23

Saxena, V., & Pandey, L. M. (2021). Design and characterization of biphasic ferric hydroxyapatite-zincite nanoassembly for bone tissue engineering. *Ceramics International*, 47(20), 28274-28287.

Cabanas, M. V., Rodriguez-Lorenzo, L. M., & Vallet-Regi, M. (2002). Setting behavior and in vitro bioactivity of hydroxyapatite/calcium sulfate cements. *Chemistry of materials*, 14(8), 3550-3555.

Amoros JL, Lunar R, and Tavira P (1981) Jarosite: A silver-bearing mineral of the gossan of Rio Tinto (Huelva) and La Union (Cartagena, Spain). *Mineralium Deposita* 16: 205–213.

Welch SA, Kirste D, Christy AG, Beavis FR, and Beavis SG (2008) Jarosite dissolution II—Reaction, kinetics, stoichiometry and acid flux. *Chemical Geology* 254: 73–86.

Cogram Peter, Jarosite, Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, Elsevier, 2018, ISBN 9780124095489, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10960-1>.

Li, X., Wang, Y., Chen, F., Chen, X., Xiao, Y., & Zhang, X. (2022). Design of macropore structure and micro-nano topography to promote the early neovascularization and osteoinductivity of biphasic calcium phosphate bioceramics. *Materials & Design*, 216, 110581.

Vezenkova, A., & Locs, J. (2022). Sudoku of porous, injectable calcium phosphate cements—Path to osteoinductivity. *Bioactive Materials*.

Zhao, H., Xing, H., Lai, Q., Zhao, Y., Chen, Q., & Zou, B. (2022). Additive manufacturing of graphene oxide/hydroxyapatite bioceramic scaffolds with reinforced osteoinductivity based on digital light processing technology. *Materials & Design*, 223, 111231.

Liguori, A., Gino, M. E., Panzavolta, S., Torricelli, P., Maglio, M., Parrilli, A., ... & Focarete, M. L. (2022). Tantalum nanoparticles enhance the osteoinductivity of multiscale composites based on poly (lactide-co-glycolide) electrospun fibers embedded in a gelatin hydrogel. *Materials Today Chemistry*, 24, 100804.

Rather, H. A., Varghese, J. F., Dhimmarr, B., Yadav, U. C., & Vasita, R. (2022). Polycaprolactone-collagen nanofibers loaded with dexamethasone and simvastatin as an osteoinductive and immunocompatible scaffold for bone regeneration applications. *Biomaterials and Biosystems*, 8, 100064.

Figueiredo, M. O., & da Silva, T. P. (2011). The positive environmental contribution of jarosite by retaining lead in acid mine drainage areas. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(5), 1575-1582.

Sasaki, K., Konno, H., 2000. Morphology of jarosite-group compounds precipitated from biologically and chemically oxidized Fe ions. *Can. Mineral.* 38, 45–56.

Smith, A.M., Hudson-Edwards, K.A., Dubbin, W.E., & Wright, K. (2006). Dissolution of jarosite [KFe₃(SO₄)₂(OH)₆] at pH 2 and 8: insights from batch experiments and computational modelling. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70, 608-621.

Navrotsky, A., Forray, F. L., & Drouet, C. (2005). Jarosite stability on Mars. *Icarus*, 176(1), 250-253.

Christensen, P.R., 26 colleagues, 2004. Mineralogy at Meridiani Planum from the Mini-TES experiment on the Opportunity rover. *Science* 306, 1733–1739.

Yadav, K., Singhal, N., Rishi, V., & Yadav, H. (2014). Cell proliferation assays. eLS.

Bueno, C .; Villegas, ML; Bertolotti, SG; Previtali, CM; Neumann, MG; Encinas, MV (2002). "La interacción de estado excitado de resazurina y resorufina con soluciones acuosas de aminesina. Fotofísica y reacción fotoquímica". *Fotoquímica y Fotobiología* . 76 (4): 385–90. doi : 10.1562 / 0031-8655 (2002) 0760385TESIOR2.0.CO2 . PMID 12405144 .

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55–63.

Yildirim, S., Zibandeh, N., Genc, D., Ozcan, E. M., Goker, K., & Akkoc, T. (2016). The Comparison of the Immunologic Properties of Stem Cells Isolated from Human Exfoliated Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Dental Follicles. *Stem Cells International*, 2016, 1–15. doi:10.1155/2016/4682875

Morsczeck, C. (2022). Mechanisms during Osteogenic Differentiation in Human Dental Follicle Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5945.

Hu, J., Cao, Y., Xie, Y., Wang, H., Fan, Z., Wang, J., & Wang, S. (2016). Periodontal regeneration in swine after cell injection and cell sheet transplantation of human dental pulp stem cells following good manufacturing practice. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 1-11.

Bi, R., Lyu, P., Song, Y., Li, P., Song, D., Cui, C., & Fan, Y. (2021). Function of dental follicle progenitor/stem cells and their potential in regenerative medicine: from mechanisms to applications. *Biomolecules*, 11(7), 997.

Hermans, F.; Hemeryck, L.; Lambrechts, I.; Bronckaers, A.; Vankelecom, H. Intertwined Signaling Pathways Governing Tooth Development: A Give-and-Take Between Canonical Wnt and Shh. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021, 9, 3043. [CrossRef]

Wang W, Yeung KWK (2017) Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: a review. *Bioact Mater* 2:224–247

Lackington, W. A., & Thompson, K. (2020). Fracture healing and progress towards successful repair. In *Racing for the Surface* (pp. 225-243). Springer, Cham.

Xu, L., Ma, F., Leung, F. K. L., Qin, C., Lu, W. W., & Tang, B. (2021). Chitosan-Strontium chondroitin sulfate scaffolds for reconstruction of bone defects in aged rats. *Carbohydrate Polymers*, 118532. doi:10.1016/j.carbpol.2021.11853

Cheng, A., Krishnan, L., Tran, L., Stevens, H. Y., Xia, B., Lee, N., ... Guldborg, R. E. (2019). The effects of age and dose on gene expression and segmental bone defect repair after BMP-2 delivery. *JBMR Plus*, 3(2), Article e10068.

Mohan, B. G., Suresh Babu, S., Varma, H. K., & John, A. (2013). In vitro evaluation of bioactive strontium-based ceramic with rabbit adipose-derived stem cells for bone tissue regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(12), 2831–2844. doi:10.1007/s10856-013-5018-y

Wong CT, Lu WW, Chan WK, Cheung KMC, Luk KDK, Lu DS, et al. In vivo cancellous bone remodeling on a strontium-containing hydroxyapatite (sr-HA) bioactive cement. *J Biomed Mater Res A*. 2004;68:513–21.

Liang, H., Hippenmeyer, S., & Ghashghaei, H. T. (2012). A Nestin-cre transgenic mouse is insufficient for recombination in early embryonic neural progenitors. *Biology open*, 1(12), 1200-1203.

Egusa, H., Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I., & Akiyama, K. (2012). Stem cells in dentistry—part I: stem cell sources. *Journal of prosthodontic research*, 56(3), 151-165.

Yamanaka, S. (2012). Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell stem cell*, 10(6), 678-684.

Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 85(1), 3-10.

Wobus, A. M., & Boheler, K. R. (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiological reviews*, 85(2), 635-678.

Krampera, M., Franchini, M., Pizzolo, G., & Aprili, G. (2007). Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transfusion*, 5(3), 120.

Banerjee, E. R. (2014). Looking for the elusive lung stem cell niche. *Translational Respiratory Medicine*, 2(1), 1-24.

Singh, V. K., Saini, A., Kalsan, M., Kumar, N., & Chandra, R. (2016). Describing the stem cell potency: the various methods of functional assessment and in silico diagnostics. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 134.

Zhou, T., Pan, J., Wu, P., Huang, R., Du, W., Zhou, Y., ... & Zhou, X. (2019). Dental follicle cells: roles in development and beyond. *Stem Cells International*, 2019.

Yao, S., Pan, F., Prpic, V., & Wise, G. E. (2008). Differentiation of stem cells in the dental follicle. *Journal of dental research*, 87(8), 767-771.

Lima, R. L., Holanda-Afonso, R. C., Moura-Neto, V., Bolognese, A. M., DosSantos, M. F., & Souza, M. M. (2017). Human dental follicle cells express embryonic, mesenchymal and neural stem cells markers. *Archives of oral biology*, 73, 121-128.

Campos, J. M., Sousa, A. C., Caseiro, A. R., Pedrosa, S. S., Pinto, P. O., Branquinho, M. V., ... & Maurício, A. C. (2019). Dental pulp stem cells and Bonelike® for bone regeneration in ovine model. *Regenerative biomaterials*, 6(1), 49-59.

Sandineni, P., Yaghoobnejad Asl, H., & Choudhury, A. (2016). Kagomé lattices as cathode: Effect of particle size and fluoride substitution on electrochemical lithium insertion in sodium- and ammonium Jarosites. *Journal of Solid State Chemistry*, 242, 78–86. doi:10.1016/j.jssc.2016.02.022

Earle, S. A., Ramirez, A. P., & Cava, R. J. (1999). The effect of gallium substitution for iron on the magnetic properties of hydronium iron jarosite. *Physica B: Condensed Matter*, 262(1-2), 199–204. doi:10.1016/s0921-4526(98)00165-3

Lu, Q., Lin, X., & Yang, L. (2020). Animal Models for Bone Tissue Engineering and Osteoinductive Biomaterial Research. In *Racing for the Surface* (pp. 245-288). Springer, Cham.

Scheller, E. L., Krebsbach, P. H., & Kohn, D. H. (2009). Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *Journal of oral rehabilitation*, 36(5), 368-389.

Morales Navarro, D. (2014). Ingeniería tisular como puntal de la medicina regenerativa en estomatología. *Revista Cubana de Estomatología*, 51(3), 288-304.

Bao, G. (2020). Biofabrication in Tissue Engineering. *Racing for the Surface*, 289-312.

Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size.

Thorwarth, M., Schultze-Mosgau, S., Kessler, P., Wiltfang, J., & Schlegel, K. A. (2005). Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 63(11), 1626-1633.

Aksel, H., & Huang, G. T. J. (2017). Human and swine dental pulp stem cells form a vascularlike network after angiogenic differentiation in comparison with endothelial cells: a quantitative analysis. *Journal of endodontics*, 43(4), 588-595.

Henkel, J., Woodruff, M. A., Epari, D. R., Steck, R., Glatt, V., Dickinson, I. C., ... & Hutmacher, D. W. (2013). Bone regeneration based on tissue engineering conceptions—a 21st century perspective. *Bone research*, 1(1), 216-248.

Almayyahi, O., Cockerill, I., Zheng, Y., & Zhu, D. (2020). Additive Manufacturing of Bioscaffolds for Bone Regeneration. In *Racing for the Surface* (pp. 313-332). Springer, Cham.

Marks Jr, S. C., & Popoff, S. N. (1988). Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *American Journal of Anatomy*, 183(1), 1-44.

Bauer TW. Bone graft substitutes. *Skeletal Radiol* 2007; 36: 1105–7.

Urist, M. R., Silverman, B. F., DÜRING, K., Dubuc, F. L., & Rosenberg, J. M. (1967). The Bone Induction Principle. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (1976-2007), 53, 243-284.

Bauer TW. Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clin Orthop* 2000; 371: 10–27.

L DI SILVIO, P JAYAKUMAR,13 - Cellular response to osteoinductive materials in orthopaedic surgery, Editor(s): Lucy Di Silvio, In Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Cellular Response to Biomaterials, Woodhead Publishing, 2009, Pages 313-343,ISBN 9781845693589, <https://doi.org/10.1533/9781845695477.2.313>.

Wilson-Hench, J. (1987). Osteoinduction. *Progress in biomedical engineering*, 4, 29.

Galli, C., Pedrazzi, G., Mattioli-Belmonte, M., & Guizzardi, S. (2018). The use of pulsed electromagnetic fields to promote bone responses to biomaterials in vitro and in vivo. *International Journal of Biomaterials*, 2018.

Samal, S. K., Dash, M., Shelyakova, T., Declercq, H. A., Uhlarz, M., Banobre-Lopez, M., ... & Dediu, V. A. Biomimetic magnetic silk scaffolds. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015; 7 (11): 6282–92.

Li, S., Dong, C., & Lv, Y. (2022). Magnetic liquid metal scaffold with dynamically tunable stiffness for bone tissue engineering. *Biomaterials Advances*, 212975.

Cai, Q., Shi, Y., Shan, D., Jia, W., Duan, S., Deng, X., & Yang, X. (2015). Osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells on poly (l-lactide)/Fe₃O₄ nanofibers with static magnetic field exposure. *Materials Science and Engineering: C*, 55, 166-173.

Kazimierczak, P., & Przekora, A. (2020). Osteoconductive and osteoinductive surface modifications of biomaterials for bone regeneration: A concise review. *Coatings*, 10(10), 971.

Yadav, D., Garg, R. K., Ahlawat, A., & Chhabra, D. (2020). 3D printable biomaterials for orthopedic implants: Solution for sustainable and circular economy. *Resources Policy*, 68, 101767.

Weiner, S., & Wagner, H. D. (1998). The material bone: structure-mechanical function relations. *Annual review of materials science*, 28(1), 271-298.

DI SILVIO, L., & JAYAKUMAR, P. (2009). Cellular response to osteoinductive materials in orthopaedic surgery. *Cellular Response to Biomaterials*, 313–343. doi:10.1533/9781845695477.2.313

Zhong, J., & Shibata, Y. (2022). The structural motifs of mineralized hard tissues from nano-to mesoscale: A future perspective for material science. *Japanese Dental Science Review*, 58, 348-356.

Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, 2015, 1–17. doi:10.1155/2015/421746

Cao, L., Yu, Y., Wang, J., Werkmeister, J. A., McLean, K. M., & Liu, C. (2017). 2- N , 6- O -sulfated chitosan-assisted BMP-2 immobilization of PCL scaffolds for enhanced osteoinduction. *Materials Science and Engineering: C*, 74, 298–306. doi:10.1016/j.msec.2016.12.004

Wang, Z., Liang, R., Jiang, X., Xie, J., Cai, P., Chen, H., ... & Zheng, L. (2019). Electrospun PLGA/PCL/OCP nanofiber membranes promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs). *Materials Science and Engineering: C*, 104, 109796.

Cognet, J.-M., Altman, M., & Simon, P. (2009). Material de osteosíntesis: tornillos y placas. *EMC - Técnicas Quirúrgicas - Ortopedia y Traumatología*, 1(1), 1–10. doi:10.1016/s2211-033x(09)71603-2.

Fernandez de Grado, G., Keller, L., Idoux-Gillet, Y., Wagner, Q., Musset, A. M., Benkirane-Jessel, N., ... & Offner, D. (2018). Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *Journal of tissue engineering*, 9, 2041731418776819.

Xu, T., He, X., Chen, Z., He, L., Lu, M., Ge, J., ... Duan, K. (2019). Effect of magnesium particles fractions on osteoinduction of hydroxyapatite spheres-based scaffold. *Journal of Materials Chemistry B*. doi:10.1039/c9tb01162e

Krüger, R., Seitz, J. M., Ewald, A., Bach, F. W., & Groll, J. (2013). Strong and tough magnesium wire reinforced phosphate cement composites for load-bearing bone replacement. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 20, 36-44.

Lai, Y., Li, Y., Cao, H., Long, J., Wang, X., Li, L., ... & Peng, J. (2019). Osteogenic magnesium incorporated into PLGA/TCP porous scaffold by 3D printing for repairing challenging bone defect. *Biomaterials*, 197, 207-219