

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

**“ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y
DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE LA ESTRUCTURA
DEL FOSFATO OCTACÁLCICO OBTENIDO POR
PRECIPITACIÓN Y DE LA HIDROXIAPATITA
OBTENIDA POR HIDRÓLISIS DEL MISMO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

P R E S E N T A

M. en C. MARÍA JOSEFINA ARELLANO JIMÉNEZ

TUTOR:
DR. JOSÉ REYES GASGA

México, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia.

Por su apoyo y comprensión.

Al Dr. José Reyes Gasga.

Por su compromiso en la dirección de este proyecto.

Al comité tutor: Dr. Ramiro García García y Dr. Octavio Álvarez Fragoso.

Por su tiempo y dedicación.

Al soporte técnico: P. Mexía Hernández, L. Rendón Vázquez, R. Hernández Reyes, C. Flores Morales, S. Tehuacanero Núñez, J. Cañetas Ortega, A. Gómez Cortés, M. Aguilar Franco y G. Mondragón Galicia.

Por las facilidades y el apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Rodrigo Velásquez Castillo y Dr. Edwin R. García.

Por sus excelentes comentarios y sugerencias.

A los miembros del jurado: Dr. Jesús Gracia Fadrique, Dra. Sandra Rodil Posada, Dr. Lauro Bucio Galindo y Dr. Jesús Arenas Alatorre.

Por sus valiosos comentarios y aportaciones para mejorar este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, particularmente al Instituto de Investigaciones en Materiales y al Instituto de Física.

Al CONACYT y al proyecto DGAPA-UNAM IN-111808 por el apoyo económico.

A mis compañeros y amigos.

Por haber compartido esta etapa de nuestras vidas y por todo lo que he aprendido de ustedes, especialmente por su apoyo en los momentos difíciles y por su complicidad en los buenos momentos.

INDICE

RESUMEN	<i>iii</i>
ABSTRACT	<i>v</i>
INTRODUCCIÓN	<i>1</i>
OBJETIVO	<i>6</i>
METAS	<i>6</i>
1 ANTECEDENTES	<i>7</i>
1.1 FOSFATO OCTACÁLCICO (OCP)	<i>7</i>
1.2 HIDROXIAPATITA (HAP)	<i>11</i>
1.3 LA RELACIÓN OCP-HAP	<i>14</i>
1.4 MODELOS DE LA INTERFASE OCP-HAP	<i>17</i>
1.5 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE FOSFATOS DE CALCIO	<i>23</i>
1.5.1 PRECIPITACIÓN	<i>23</i>
1.5.2HIDRÓLISIS	<i>29</i>
2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	<i>33</i>
2.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS X	<i>33</i>
2.1.1 PRINCIPIOS BÁSICOS	<i>33</i>
2.1.2 EL MÉTODO DE RIETVELD	<i>37</i>
2.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	<i>39</i>
2.2.1 GENERALIDADES	<i>40</i>
2.2.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	<i>42</i>
2.2.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	<i>43</i>
2.2.4 ANÁLISIS DE IMÁGENES DE TEM DE ALTA RESOLUCIÓN	<i>49</i>
3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	<i>51</i>
3.1 PRODUCCIÓN DE OCP	<i>51</i>
3.2 CARACTERIZACIÓN DE OCP	<i>53</i>
3.3 HIDRÓLISIS DE OCP	<i>55</i>

3.4 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL HIDROLIZADO	56
4 RESULTADOS	59
4.1 CARACTERIZACIÓN DE OCP	59
4.1.1 MEB	60
4.1.2 DRX	61
4.1.3 REFINAMIENTO DE LA ESTRUCTURA POR EL MÉTODO DE RIETVELD	63
4.1.4 MET	65
4.2 CARACTERIZACIÓN DESPUÉS DE LA HIDRÓLISIS	68
4.2.1 MEB	69
4.2.2 DRX	70
4.2.3 REFINAMIENTO DE LA ESTRUCTURA POR EL MÉTODO DE RIETVELD	71
4.2.4 MET	74
4.2.5 SOBRE LA INTERFASE OCP-HAP	78
5 DISCUSIÓN	81
6 CONCLUSIONES	91
REFERENCIAS	93
ANEXOS	101

RESUMEN

El presente trabajo se divide en dos etapas principales: la primera es la obtención del fosfato octacálcico (OCP; $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y la segunda es la transformación controlada de éste en hidroxiapatita (HAP; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), con el fin de obtener y analizar las características estructurales de un material donde ambas fases coexistan.

En la primera etapa, la más importante por cuanto a la dificultad para obtener el OCP en condiciones de pureza y libre de otras fases de fosfato de calcio, se logró producir OCP por precipitación, empleando 250 mL de disolución 0.04 M de acetato de calcio ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), y 750 mL de una disolución de fosfatos compuesta con 5 mmol de fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) y 5 mmol de fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4). El proceso se llevó a cabo a temperatura controlada de 60 °C y con un pH inicial de 5. El material separado y seco es un polvo de color blanco, con textura suave y ligeramente higroscópico. El análisis de los patrones de difracción de rayos X y de los patrones de difracción de electrones obtenidos por microscopía electrónica confirmó que el polvo está formado únicamente por OCP, y que no existe la presencia de otras fases. Los parámetros calculados por el método de Rietveld fueron: $a=19.70$, $b=9.50$, $c=6.85$ Å; $\alpha=90.03^\circ$, $\beta=92.48^\circ$, $\gamma=108.32^\circ$ (triclínico P-1) y tamaño promedio de cristal 45.2 ± 0.6 nm.

En la segunda etapa, se realizó la hidrólisis directa del fosfato a diferentes intervalos de tiempo, que era determinante para comprobar la formación de HAP a partir de la estructura de OCP. Se registró que la transformación total de OCP en HAP ocurre después de seis horas de reacción. Al analizar el efecto de menores tiempos de reacción, se observó que en la muestra hidrolizada durante 30 minutos coexiste OCP con HAP en una proporción que permitió su análisis estructural por microscopía electrónica. Los parámetros calculados por el método de Rietveld para cada una de las fases fueron: para OCP $a=19.70$, $b=9.50$, $c=6.85$ Å; $\alpha=90.03^\circ$, $\beta=92.48^\circ$, $\gamma=108.32^\circ$ (triclínico P-1) con tamaño promedio de cristal de 15.4 ± 0.2 nm y para HAP $a=9.45$, $c=6.87$ Å (hexagonal $P6_3/m$) con tamaño promedio de cristal de 15.7 ± 0.6 nm.

Es importante señalar que la interacción del haz electrónico con este tipo de muestras produce marcados efectos en la estructura cristalina de la fase OCP, lo cual genera complicaciones para el estudio detallado de las fases OCP y HAP por microscopía electrónica de transmisión.

ABSTRACT

Octacalcium phosphate (OCP) powder was produced by precipitation. Reaction occurs adding 250 mL of calcium acetate $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 0.04 M into 750 mL of phosphate solution (5 mmol Na_2HPO_4 and 5 mmol NaH_2PO_4) at a constant temperature of 60 °C and pH of 5. A soft, white and hygroscopic powder was obtained. X-ray diffraction (XRD), electron diffraction pattern (SAED) and transmission electron microscopy (TEM) analysis have confirmed only OCP. Lattice parameters were calculated using the Rietveld method. $a=19.70$, $b=9.50$, $c=6.85$ Å; $\alpha=90.03^\circ$, $\beta=92.48^\circ$, $\gamma=108.32^\circ$ (triclinic P-1) and average crystal size 45.2 ± 0.6 nm.

Hydroxyapatite (HAP) was obtained by direct hydrolysis of the OCP powder. The complete transformation of OCP into HAP was registered over a time of six hours. During the first thirty minutes of hydrolysis, both phases OCP and HAP coexisted and they were structurally analyzed by XRD and TEM. OCP and HAP parameters were calculated using the Rietveld method: $a=19.70$, $b=9.50$, $c=6.85$ Å; $\alpha=90.03^\circ$, $\beta=92.48^\circ$, $\gamma=108.32^\circ$ (triclinic P-1) with average crystal size 15.4 ± 0.2 nm and $a=9.45$, $c=6.87$ Å (hexagonal $P6_3/m$) with average crystal size 15.7 ± 0.6 nm, respectively.

The interaction between the electron beam and the sample presents a remarkable effect on the OCP stability. This represents an important

experimental problem to be taken in account during the study and detailed analysis of the OCP and HAP phases by transmission electron microscopy.

INTRODUCCIÓN

La importancia del fosfato octacálcico (OCP; $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y la hidroxiapatita (HAP; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{HO})_2$) en el campo de los biomateriales se debe a que ambos fosfatos de calcio son de interés biológico en el contexto de la formación de tejido mineralizado [1,2]. Se sabe que el OCP está involucrado en la formación de hueso, esmalte dental y diversos cálculos, mientras que la HAP es el principal constituyente de todos ellos [3]. El interés sobre la nucleación y el crecimiento de estos fosfatos de calcio, particularmente del papel que juega el OCP en la nucleación y crecimiento de HAP, se ha incrementado en la actualidad debido a su efecto en los procesos de mineralización y desmineralización [2]. De aquí la utilidad de producirlos sintéticamente, ya que el control de un método para obtener OCP y HAP abre las posibilidades para el estudio de sus propiedades e interacciones en común.

En general para la obtención de fosfatos de calcio se debe tener un cuidadoso control de las variables del proceso, ya que existe una relación muy cercana entre las diferentes fases que participan durante una reacción de precipitación. En la naturaleza, la precipitación y la disolución generalmente están asociadas con reacciones que involucran más de una fase [3]. Por ejemplo, en sistemas biológicos como calcificaciones patológicas (cálculos dentales y renales) pueden estar involucrados procesos simultáneos de mineralización y desmineralización donde puede

coexistir más de un fosfato de calcio [4]. Actualmente se reconoce que la cristalización de muchas sales poco solubles involucran la formación de fases precursoras metaestables que subsecuentemente se disuelven a medida que la reacción avanza [5]. Por lo tanto, aún cuando ya se han realizado investigaciones acerca del crecimiento de fases individuales, los procesos *in vivo* requieren el estudio del crecimiento simultáneo de diversas fases de fosfato de calcio [6]. Particularmente el crecimiento de OCP es complicado debido a la cercanía entre los valores de equilibrio en disolución con otras fases como el fosfato dicálcico y el fosfato tricálcico. Además, se ha demostrado que la estabilidad del OCP disminuye con la temperatura y el pH [7, 8], por lo cual la síntesis de este fosfato de calcio debe efectuarse bajo condiciones muy precisas donde se determine cuidadosamente el grado de saturación y se controle la presencia de iones y moléculas extraños. En este sentido, el condensado de los métodos que se emplean en la obtención de fosfatos de calcio [4] resulta de gran utilidad para el caso particular de preparar OCP.

Conjuntamente se ha demostrado que, bajo determinadas consideraciones termodinámicas [4], el OCP es una fase metaestable que después de un determinado tiempo se transforma en HAP para alcanzar el equilibrio [9, 10]. Existen dos mecanismos propuestos [11-13] a partir de los cuales OCP puede producir HAP, uno de ellos es por hidrólisis *in situ* de OCP y el otro es por disolución de OCP seguida de precipitación de HAP. En el primero se propone que el punto inicial es la precipitación de

OCP. Posteriormente éste se hidroliza irreversiblemente *in situ* a un producto intermedio entre OCP y HAP, que se denomina OCP hidrolizado (OCPH) y que contiene dominios de OCP y de HAP en diferentes cantidades [12]. Finalmente se obtiene HAP. Es importante considerar que el proceso de hidrólisis es una reacción irreversible en estado sólido, por lo que el producto puede ser altamente imperfecto y heterogéneo. El segundo mecanismo plantea un proceso de dos pasos donde inicialmente el OCP precipita de la disolución y en seguida una capa de éste, de una celda unitaria de espesor, reacciona en la disolución y forma una capa de HAP, de dos celdas unitarias de espesor [13]. En este caso, dependiendo de la velocidad relativa del proceso, la fase final puede ser OCP o HAP. Cualquiera que sea el mecanismo de transformación, el arreglo final entre ambas fases dependerá de la química de la disolución, pues la reactividad del OCP depende sobre manera de cómo es producido [14]. De aquí que las relaciones entre la razón de hidrólisis, la evolución estructural y las variaciones en los parámetros de la disolución durante la transformación de OCP en HAP resulten de gran interés.

En este trabajo de tesis se presenta el proceso de preparación y análisis de un material donde coexisten dos fases: el OCP y la HAP. Partiendo de la producción del primero (el OCP) por precipitación se genera el segundo (la HAP) por hidrólisis. La coexistencia de ambas fases se logra controlando el tiempo de reacción, al detener el proceso de hidrólisis antes de que el OCP se transforme completamente. El análisis de las fases se

llevó a cabo por microscopía electrónica de transmisión y difracción de rayos X.

Partiendo del hecho de que los fosfatos de calcio comprenden una gran familia de compuestos con importantes aplicaciones biológicas y numerosos usos tecnológicos, que van desde recubrimientos para implantes, elementos de fijación y adhesivos para reparaciones óseas hasta vehículos para transportar fármacos o proteínas [15], resulta indiscutible que su estudio sea de gran importancia en el campo de los biomateriales. En este contexto, establecer el papel que juegan el OCP y la HAP dentro de los procesos de biomineralización ha sido de gran interés para explicar el mecanismo de formación de huesos y dientes [16]. Es aquí donde continúa vigente la discusión acerca del arreglo que guarda el OCP cuando participa en el crecimiento de la HAP.

Por una parte en el campo de la odontología se tiene evidencia de que el OCP es el precursor en la nucleación de cristales de HAP durante las etapas tempranas de la amelogénesis [17, 18], aún cuando el papel que desempeña cada una de estas fases sigue siendo un punto de controversia. Por otra parte, en las aplicaciones de tipo protésico se ha reportado el uso de OCP como material base que propicia el crecimiento de HAP [19-22], al igual que su empleo dentro de investigaciones en ingeniería de tejidos [18, 23] y en estudios de mineralización realizados bajo condiciones fisiológicas [24, 25]. Así pues, en todos los casos donde se promueve el crecimiento de HAP a partir de OCP, el proceso sugiere la presencia o formación de una

interfase entre estos fosfatos. Sin embargo la estabilidad de esta unión, su arreglo y las propiedades cristalográficas resultantes del proceso continúan siendo grandes temas de debate.

Por todo lo anterior, la importancia del presente trabajo de tesis radica en obtener nueva evidencia acerca de las características que presentan estas fases cuando coexisten, abordando el tema desde un punto de vista experimental que incluye tanto la transformación de OCP en HAP como el estudio de la interfase que ellas conforman en términos de la relación de orientación entre ambas estructuras.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es producir un material donde coexistan las fases OCP y HAP por medio de procesos de precipitación e hidrólisis y caracterizar estructuralmente su interfase para establecer la relación entre las orientaciones cristalográficas de las mismas.

METAS

- ✓ Obtener OCP por precipitación, libre de otras fases de fosfato de calcio.
- ✓ Caracterizar la estructura del OCP por difracción de rayos X y microscopía electrónica.
- ✓ Determinar las condiciones que permitan obtener partículas con presencia de ambas fases, OCP y HAP, por hidrólisis.
- ✓ Caracterizar por difracción de rayos X la estructura de ambas fases en el material hidrolizado.
- ✓ Caracterizar por microscopía electrónica el material donde coexistan ambas fases para determinar la relación de orientación entre ellas.

1. ANTECEDENTES

1.1 FOSFATO OCTACÁLCICO (OCP)

El fosfato octacálcico (OCP) tiene por fórmula $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y es uno de los fosfatos de calcio que cobra gran importancia por ser considerado como precursor de hidroxiapatita [26]. Sus datos cristalográficos se condensan en la tabla 1.1 y la figura 1.1 muestra la celda de OCP en el plano (001).

Tabla 1.1
Datos cristalográficos del fosfato octacálcico.
[PDF 44-0778]

Fórmula	$\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	$\text{P}\bar{1}$
Parámetros de red	$a = 1.987, b = 0.963, c = 0.6875 \text{ nm}$ $\alpha = 89.3^\circ, \beta = 92.2^\circ, \gamma = 108.95^\circ$
Volumen	124.33 nm^3
Densidad	0.656 g/cm^3
Peso molecular	982.56 g/mol
Z	2

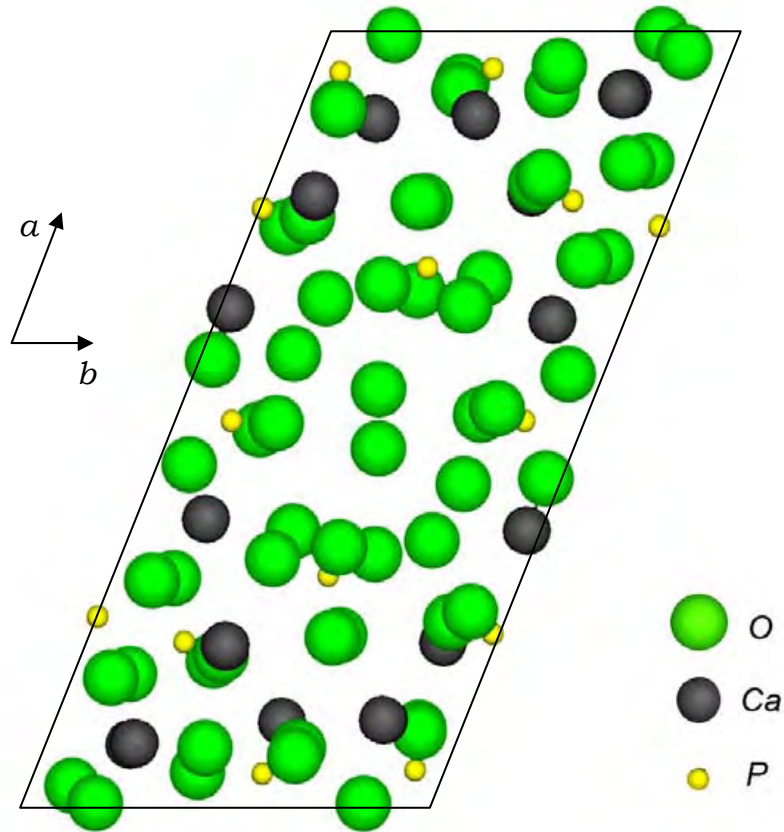


Figura 1.1 Estructura de fosfato octacálcico en el plano (001).

El OCP tiene una estructura laminar a lo largo del eje a , donde se alternan dos tipos de capas, una denominada “tipo apatita” y la otra llamada “hidratada”. En la figura 1.2 se puede reconocer un fragmento de la celda unitaria de hidroxiapatita en la primera capa, pues los iones calcio y fosfato están distribuidos en forma similar a ésta. Las capas hidratadas por su parte, contienen agua reticular y los iones calcio y fosfato se encuentran más espaciados entre sí. De tal forma que las capas hidratadas con cerca de 0.8 nm de espesor alternan con capas tipo apatita de aproximadamente 1.1 nm de espesor, paralelas a la cara (100). La capa

tipo apatita contiene seis de los iones calcio y dos de los iones fosfato, mientras que los otros dos iones calcio y un ion fosfato están en la capa hidratada. Este ion fosfato y los tres iones que caen en la unión de las dos diferentes capas están protonados [5, 26, 27].

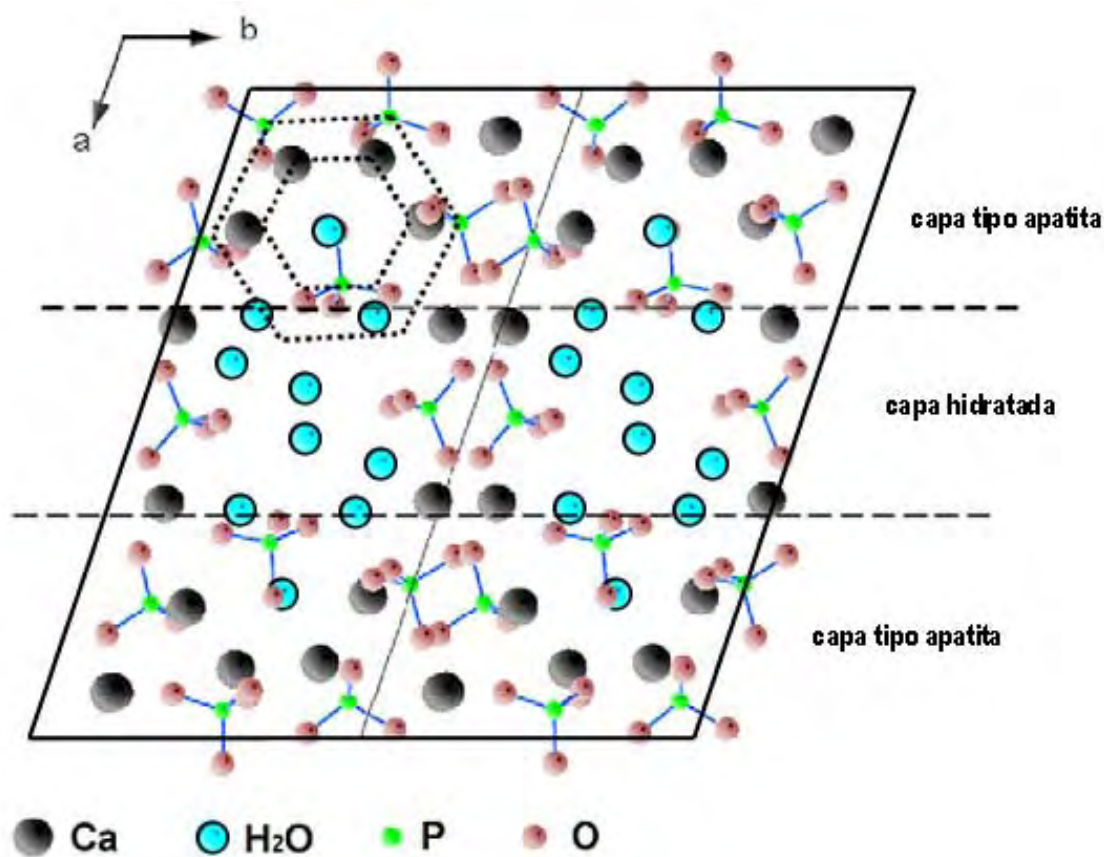


Figura 1.2 Estructura laminar de fosfato octacálcico [28].

Los patrones simulados de difracción de área selecta para OCP a lo largo de los ejes de zona [100], [010], [001] y [110] se presentan en la figura 1.3. Estos patrones muestran las características geométricas de las reflexiones para cada uno de los ejes de zona y son de gran utilidad para la

indexación de los patrones de difracción experimentales y de las transformadas rápidas de Fourier (FFT) del OCP, ya que permiten relacionar la geometría, las distancias entre planos y los ángulos que forman con el eje de zona y con los índices que corresponden a las familias de planos que les dan origen.

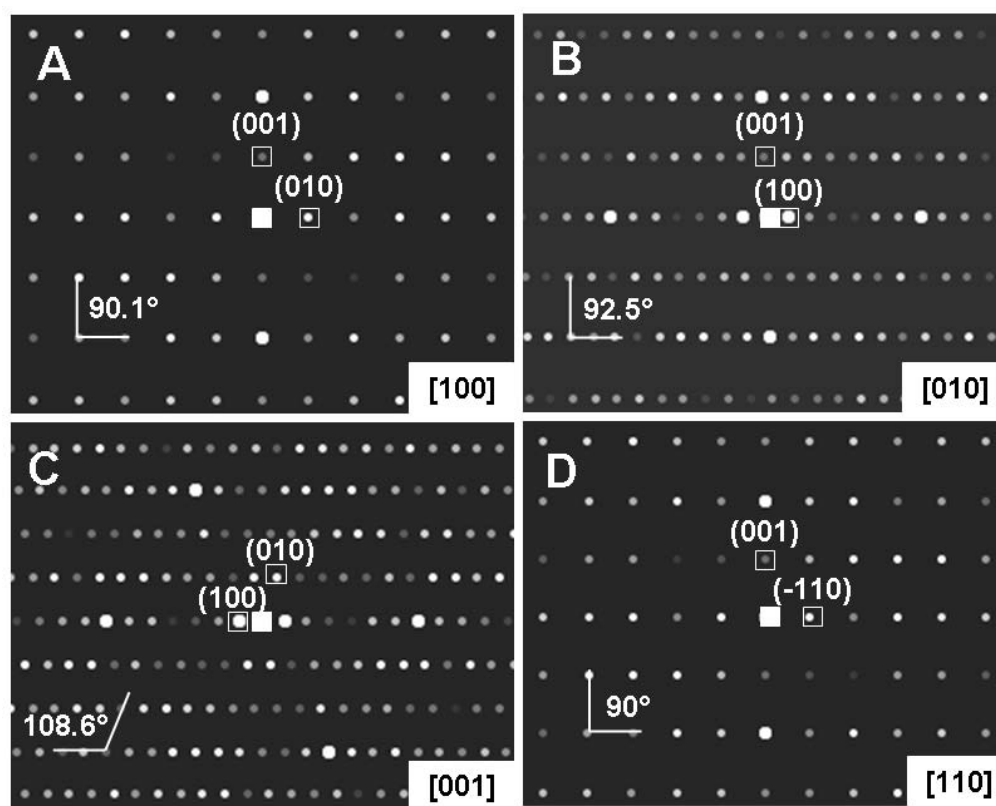


Figura 1.3 Patrones simulados de difracción de electrones para OCP. A) [100], B) [010], C) [001] y D) [110].

1.2 HIDROXIAPATITA (HAP)

La hidroxiapatita (HAP), con fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, ha tenido gran atención en los últimos años debido a sus características y aplicaciones. Desde el punto de vista biológico, la HAP es el fosfato de calcio más importante debido a sus semejanzas estructurales con el tejido duro [1, 2]. En la tabla 1.2 se concentran sus datos cristalográficos y en la figura 1.4 se observa la celda unitaria de HAP en el plano (0001).

Tabla 1.2
Datos cristalográficos de la hidroxiapatita.
[PDF 24-0033]

Fórmula	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$
Sistema cristalino	hexagonal
Grupo espacial	$P6_3/m$
Parámetros de red	$a = 0.9421, c = 0.6882 \text{ nm}$
Volumen	53.014 nm^3
Densidad	3.140 g/cm^3
Peso molecular	502.32 g/mol
Z	2

Los cristales de HAP pueden tener celda unitaria hexagonal o monoclinica [29-31]. En la forma monoclinica, los iones fosfato se encuentran en hileras a lo largo del eje a , con los iones calcio e hidroxilo

localizados entre los grupos fosfato. Los iones calcio se encuentran localizados en dos triángulos rodeando dos iones hidroxilo en hexágonos mayores alrededor de esas posiciones de calcio. Los iones hidroxilo están situados tanto arriba como debajo de los planos de los iones calcio. Las hileras de iones hidroxilo están dirigidas, alternadamente, hacia arriba y hacia abajo.

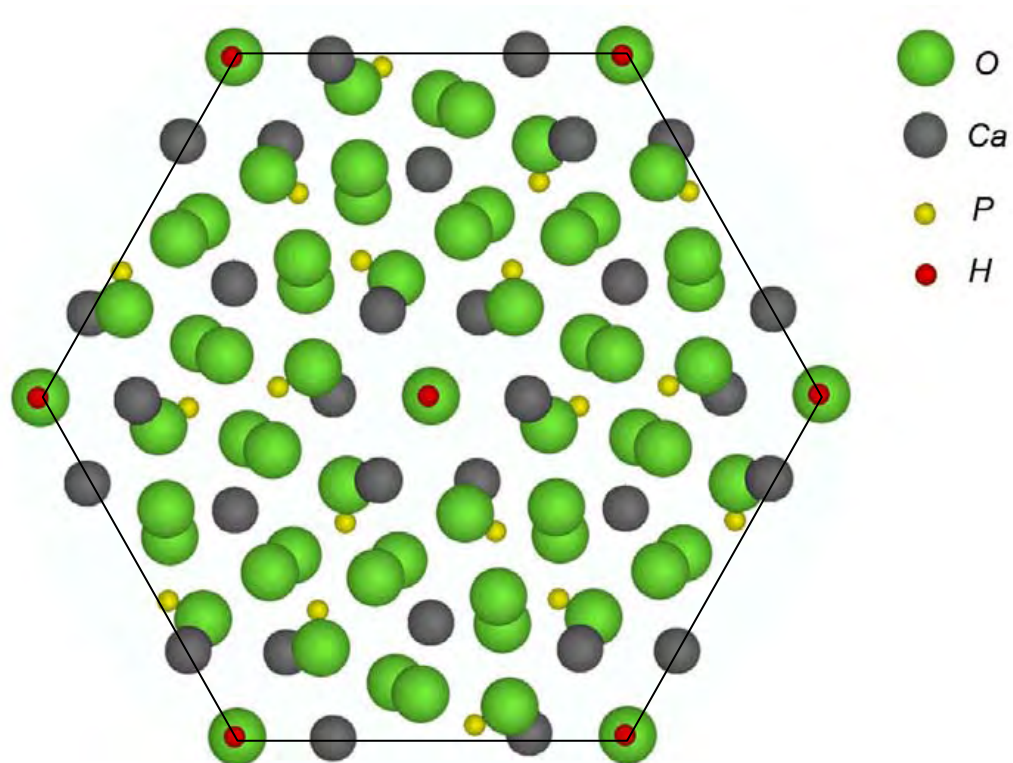


Figura 1.4 Estructura de hidroxipatita en el plano (0001).

La forma hexagonal de HAP, generalmente encontrada en apatitas biológicas, tiene una estructura similar a la monoclinica pero con columnas de calcio y grupos hidroxilo localizadas en canales paralelos [30]. La sustitución de iones puede ocurrir rápidamente en esos canales, y

esto puede contar para el alto grado de sustitución que se observa en las apatitas naturales. Además, en la HAP hexagonal los iones hidroxilo están más desordenados en cada fila, comparada con la forma monoclinica, ubicándose tanto por arriba como por debajo de la estructura, lo cual introduce esfuerzos que son compensados por sustitución o vacancias [30]. Estas son las principales razones por las que normalmente la HAP hexagonal es una fase no estequiométrica.

La figura 1.5 presenta los patrones simulados de difracción de área selecta de la HAP a lo largo de los ejes de zona $[0001]$ $[1\bar{2}10]$ y $[10\bar{1}0]$. Se puede observar el arreglo geométrico característico para cada eje de zona, la relación de las distancias y los ángulos entre planos y los índices que corresponden a cada uno de ellos. En combinación con los patrones simulados para OCP de la figura 1.3, estos modelos son de utilidad para el análisis de la difracción electrónica de las muestras sometidas al proceso de hidrólisis y para la identificación de las FFT de las imágenes experimentales.

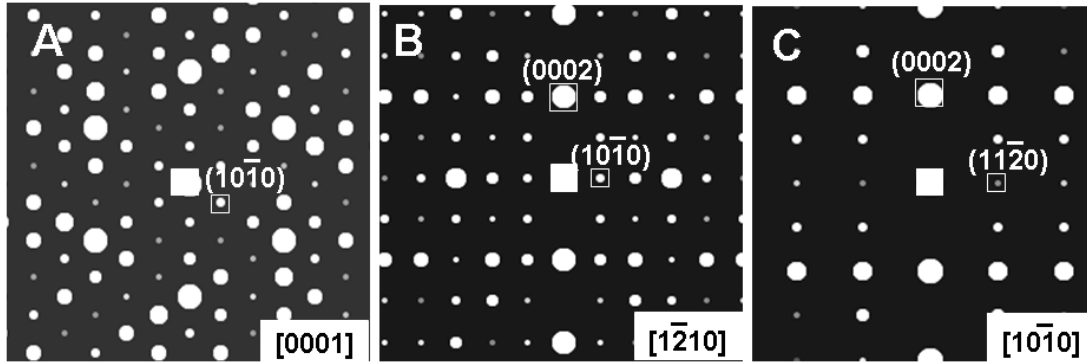


Figura 1.5 Patrones simulados de difracción de electrones para HAP en las direcciones A) [0001], B) [12̄10] y C) [10̄10].

1.3 LA RELACIÓN OCP-HAP

En las últimas décadas se ha propuesto que, desde el punto de vista biológico, el OCP participa como una fase mineral inicial en el proceso de formación de apatitas. A partir de los 1960s se ha discutido que el OCP es un precursor de transición o intermediario para la apatita biológica [4, 11] por ser termodinámicamente menos estable que la apatita en condiciones fisiológicas y porque comparte planos cristalográficos semejantes a los de HAP. En los 1970s algunos estudios realizados sobre la apatita presente en los huesos de vertebrados [11, 27] sustentaron la idea de que ésta podría tener como precursor al OCP.

Actualmente, un punto que permanece en discusión es el hecho de que la formación de un mineral *in vitro* puede ser muy diferente de la formación *in vivo*. Aún cuando se ha detectado la existencia de OCP durante la formación primaria de HA *in vitro* [2, 16], la teoría de que éste es la fase precursora para la apatita biológica continúa en estudio, pues

debido a la complejidad del ambiente *in vitro* en algunos casos la formación del cristal se ve afectada, de tal manera que solo se reporta la presencia de “OCP modificado” o de un “mineral tipo OCP” [32, 33]. Es por eso que, aún cuando la presencia de capas tipo apatita en la estructura de OCP sugiere que puede ser una fase precursora lógica de apatita biológica, esta idea permanece en debate [34].

Hasta ahora un hecho que apoya fuertemente esta hipótesis proviene de los resultados reportados sobre cristales de dentina calcificada [4] donde se observa la presencia de OCP en la parte central y de HAP en los extremos de un mismo cristal. Asimismo, estudios *in vitro* [35-37] han demostrado que la HAP es capaz de crecer sobre la superficie de OCP, en modelos de crecimiento de esmalte dental.

Recientemente se obtuvieron resultados experimentales en síntesis de fosfatos de calcio [38, 39] que indican que HAP y OCP pueden formar una interfase con coherencia estructural. Una razón de esto es la semejanza entre la estructura cristalina de OCP y la de HAP [14, 26, 30]. Entonces se propuso que la capa hidratada de la celda unitaria de OCP puede formar una interfase entre HAP y la disolución que la rodea [14]. Si esto ocurre, el crecimiento epitaxial de OCP y HAP se ve favorecido.

Considerando además que termodinámicamente el OCP es una fase metaestable que cristaliza de forma rápida [11], se ha propuesto que un precipitado inicial de OCP se transforma en HAP por hidrólisis y que también puede actuar como estructura base del crecimiento epitaxial de

HAP. A partir de los estudios realizados sobre estados de transición en la precipitación espontánea de fosfato de calcio bajo condiciones fijas de pH [39] se obtuvo una clara demostración de la presencia de OCP como intermediario en la precipitación de HAP.

Al comparar imágenes de OCP sintético con las de apatita con un defecto central se observa una marcada semejanza entre ellas [5]. Esos defectos centrales son más sensibles a la disolución con ácido que el resto del cristal. Al evaluar el comportamiento de disolución de apatitas sintéticas y de apatitas biológicas que contenían el defecto central [40] se observó que en las primeras la disolución ocurre tanto en la superficie como al centro del cristal, mientras que en la apatita biológica se presenta disolución central preferente. Esto puede deberse a la presencia de OCP en el centro del cristal, sin descartar que también puede atribuirse a la presencia de impurezas como carbonato [40].

Por lo tanto, la semejanza con la estructura de HAP, la mayor solubilidad debida al contenido de agua en los cristales de OCP, así como lo reportado acerca de su participación en la formación de hueso, esmalte y varios tejidos calcificados patológicos, son elementos importantes que sugieren que OCP actúa como un precursor en la formación de HAP [2, 5]. Esta consideración en el contexto de la formación de tejido mineralizado y los resultados obtenidos en experimentos de cristalización de fosfato de calcio [41] traen como consecuencia un creciente interés en el estudio de la nucleación, orientación, morfología y ensamble de las fases OCP y HAP.

Su importancia radica principalmente en que puede ser utilizado para explicar conceptos generales y en particular las causas de formación y destrucción de algunos tejidos calcificados.

1.4 MODELOS DE LA INTERFASE OCP-HAP

Tomando como base los parámetros de red de OCP y HAP, resulta fácil sugerir que sus celdas unitarias se unirán de tal modo que el eje [0001] de la HAP sea paralelo al eje [001] del OCP. Si se observa que el parámetro c de la HAP mide 0.6882 nm y para el OCP mide 0.6875 nm, unirlos implica apenas el 0.1% de desajuste. Mientras que al acoplar el parámetro b de HAP que mide 0.9421 nm con el de OCP que mide 0.963 nm se observa un desajuste del 2.17%, el cual puede considerarse pequeño pero suficiente para hacer posible la existencia de defectos en la interfase.

Inicialmente, Brown y sus colaboradores [27] sugirieron un primer modelo para la interfase OCP-HAP basados en consideraciones puramente geométricas. Tomando en cuenta lo cercano que se encuentra el parámetro b en ambas estructuras, se propuso un modelo donde el eje [0001] de la HAP es paralelo al eje [001] del OCP, y a la vez el eje $[\bar{1}2\bar{1}0]$ de la HAP es paralelo al eje [100] del OCP (figura 1.6). Sus principales características son las siguientes:

- La dirección $[\bar{1}2\bar{1}0]$ de la celda unitaria de HAP se acopla con una celda unitaria de OCP a lo largo de la dirección $[010]$.
- La relación entre los ejes indica que la dirección $[\bar{1}2\bar{1}0]$ de HAP es paralela a la dirección $[010]$ de OCP y que la dirección $[0001]$ de HAP es paralela a la dirección $[001]$ de OCP.
- El ángulo entre las direcciones $[\bar{1}\bar{1}20]$ de HAP y $[010]$ de OCP es de 167° .

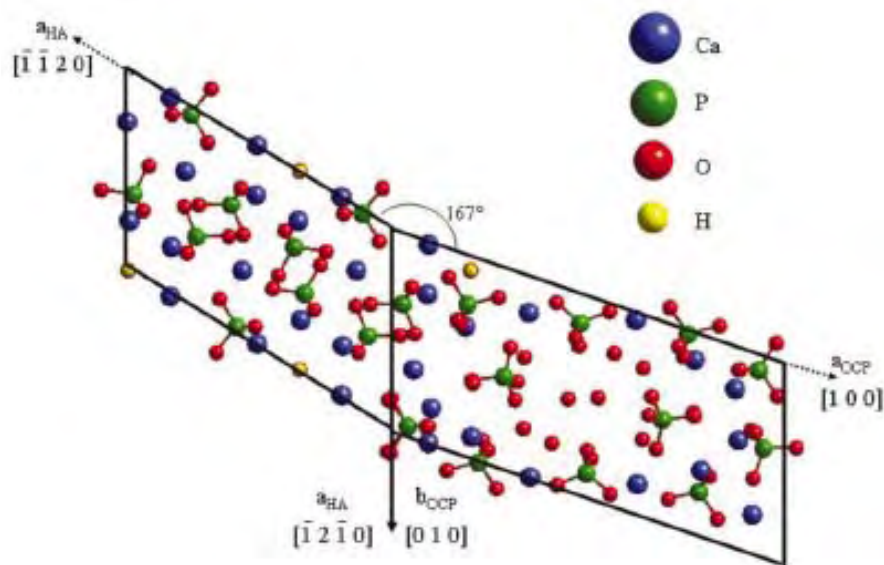


Figura 1.6 Modelo de la interfase OCP-HAP propuesto por Brown [27].

Posteriormente, Fernández y colaboradores [42] presentaron un nuevo modelo para la interfase OCP-HAP. El punto de partida fue la simulación de la interfase usando como base el modelo de Brown. Al realizar el relajamiento de la interfase se observó que nunca alcanzaba a relajarse, sino que por el contrario se presentaban inconsistencias con la energía libre del sistema y por lo tanto la interfase era inestable. Esto los llevo a estudiar el modelo de Brown con mayor cuidado y desde el punto de vista de la energía libre. Utilizando métodos de campo autoconsistente para ambos modelos se observó que al sustituir el eje c por el eje $-c$ en la celda unitaria de la HAP, el modelo de la interfase presenta una configuración de mínima energía. Se demuestra además que en la nueva configuración los átomos tienen ambientes similares a los propios de las celdas de HAP y OCP. Como resultado el nuevo modelo (figura 1.7) produce una interfase OCP-HAP más estable y tiene las siguientes características:

- Está formado por la mitad de una celda unitaria de HAP y una celda unitaria de OCP, unidas a lo largo de las direcciones $[12\bar{1}0]$ de HAP y $[010]$ de OCP.
- El eje $-c$ de HAP es paralelo al eje c de OCP.
- El ángulo entre el eje $[11\bar{2}0]$ de HAP y el eje $[100]$ de OCP es 131° .

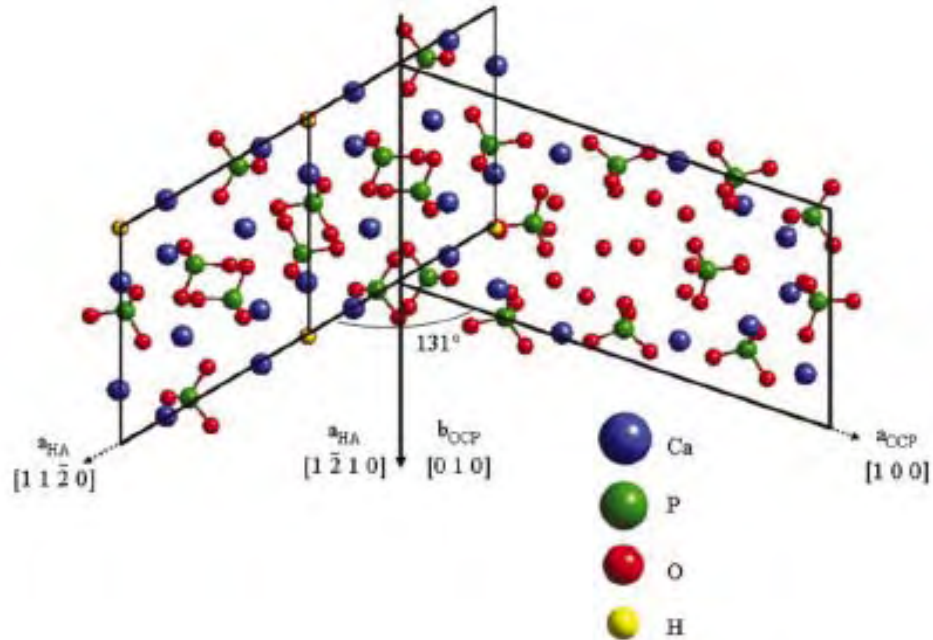


Figura 1.7 Modelo de la interfase OCP-HAP propuesto por Fernández, Reyes-Gasga y colaboradores [42].

Recientemente se ha propuesto un tercer modelo por Xin y colaboradores [43], en donde la transformación de OCP en HAP es inducida por irradiación con el haz electrónico dentro del microscopio electrónico de transmisión (MET). El proceso de transformación y los cambios en la estructura cristalina se examinaron vía imágenes de campo claro, difracción electrónica, imágenes de alta resolución y sus transformadas rápidas de Fourier. Los resultados indican que ocurre un mecanismo de transformación en estado sólido en los cristales de OCP. Las observaciones en MET y el análisis en la estructura del cristal sugieren que la orientación cristalográfica es OCP (010) paralelo a HAP (0110) y OCP (001) paralelo a HAP (0011). La primera concuerda con el modelo de Brown

[27] y con otras observaciones de HRTEM [41]. Sin embargo, la segunda no concuerda con los reportes previos. Para explicarlo construyeron un modelo de los cristales de HAP y OCP y encontraron muchos desajustes entre los iones calcio y fosfato a lo largo de (110) de OCP y los planos (110) de HAP, por lo que se sugiere que no podría darse este crecimiento. Analizando el arreglo atómico en ambos cristales encontraron una explicación alternativa para la orientación observada y proponen un modelo (figura 1.8) con las siguientes características:

- El plano (010) de OCP es paralelo a $(0\bar{1}\bar{1}0)$ de HAP y el plano (001) de OCP es paralelo a $(000\bar{1})$ de HAP.
- Los planos $(0\bar{1}\bar{1}0)$ de HAP crecen a lo largo de los planos (010) de OCP mientras que los planos $(00\bar{1}\bar{1})$ de HAP permanecen paralelos a los planos (001) de OCP.

Actualmente no existen los suficientes resultados experimentales que indiquen cual de los modelos propuestos es el más adecuado. Por lo que una de las metas de este trabajo es presentar resultados que permitan acercarse a dilucidar este punto. En la tabla 1.3 se resumen las principales características de cada uno de ellos.

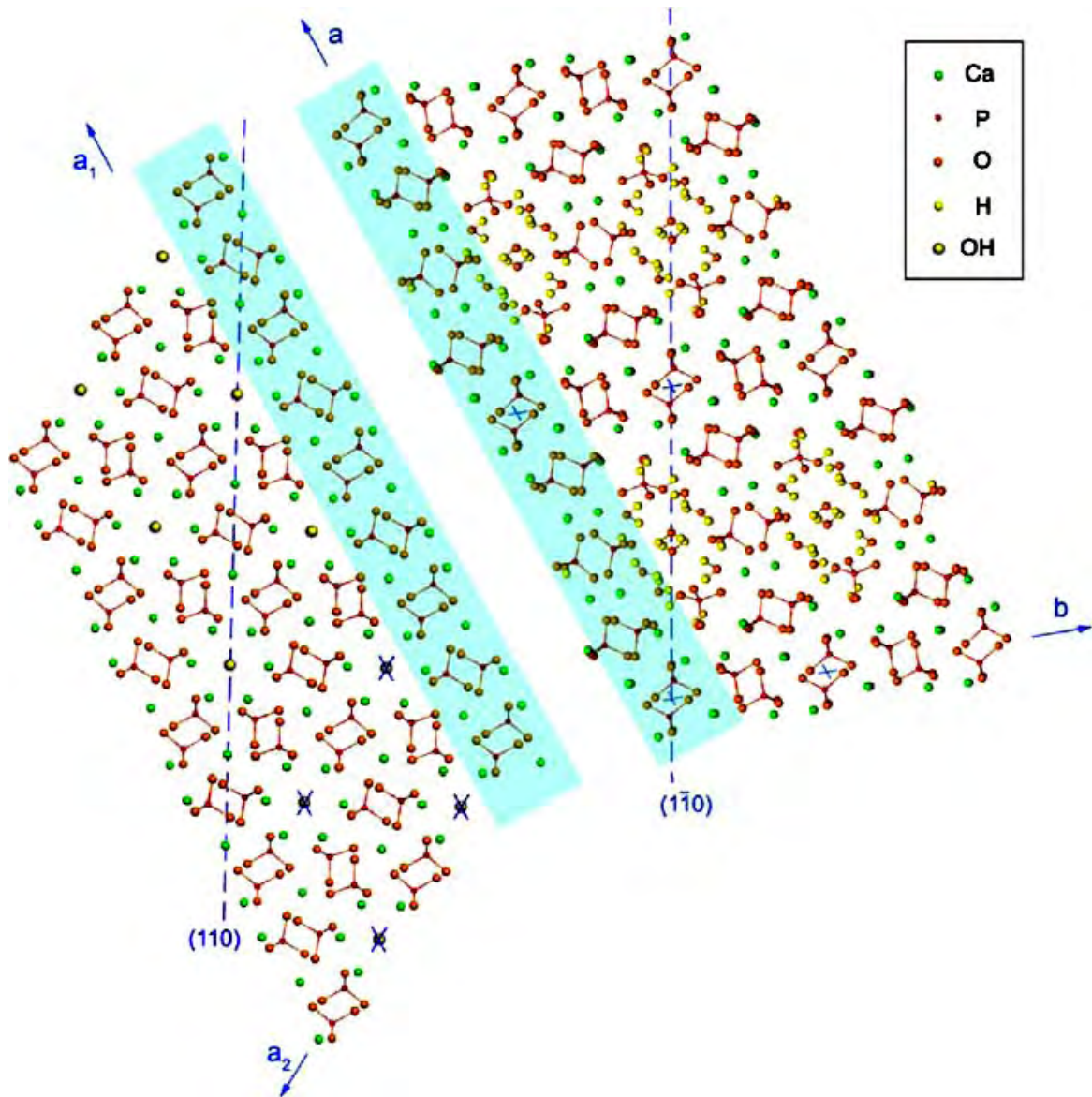


Figura 1.8 Modelo de la interfase OCP-HAP propuesto por Xin [43].

Tabla 1.3

Principales características de los modelos de interfase OCP-HAP.

Autor	Uniones	Ángulo formado
Brown [27]	a_{HAP} con b_{OCP}	167° entre a_{HAP} y a_{OCP}
Fernández [42]	$-a_{\text{HAP}}$ con a_{OCP}	131° entre a_{HAP} y a_{OCP}
Xin [43]	a_{HAP} con a_{OCP}	128° entre a_{HAP} y b_{OCP}

1.5 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE OCP Y HAP

Los fosfatos de calcio pueden obtenerse por varios métodos y sus características, cantidad y propiedades dependerán de cuál de ellos se utilice. Actualmente se considera a los métodos por vía húmeda (precipitación e hidrólisis) como algunos de los más importantes [4]. Éstos se utilizan frecuentemente debido a que son relativamente fáciles de conducir, pues las reacciones se llevan a cabo en solución acuosa y a bajas temperaturas, generalmente menos de 100 °C. El producto obtenido por este método posee una gran área superficial y una partícula de tamaño fino, aunque no son estequiométricos y tienen baja cristalinidad. Las características finales dependen de factores como el pH, el tiempo de envejecimiento, la temperatura, el tipo y la concentración de los reactivos y la presencia de otros iones.

1.5.1 PRECIPITACIÓN

La elucidación de los mecanismos de precipitación en soluciones que contienen iones calcio y fosfato proporciona un avance no solo por la necesidad de calcular las actividades de especies iónicas en la disolución sino también por las numerosas fases de calcio y fosfato que pueden involucrarse en las reacciones de cristalización [44]. En los procesos de precipitación se han caracterizado al menos cinco fases poco solubles de fosfato de calcio. Éstas incluyen el fosfato dicálcico dihidratado, fosfato

dicálcico anhidro, fosfatos tricálcico alfa y beta, OCP y HAP. Las fórmulas y abreviaturas de estos fosfatos se resumen en la tabla 1.4.

Tabla 1.4
Principales fases de fosfato de calcio.

Nombre	Abrev.	Fórmula	Razón Ca/P	Sistema cristalino
Fosfato monocálcico monohidratado	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.50	Triclínico a=5.6261 Å b=11.889 Å c=6.4731 Å α=98.633° β=118.262 ° γ=83.344 °
Fosfato monocálcico anhidro	MCPA	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.50	Triclínico a=7.566 Å b=8.258 Å c=5.549 Å α=109.2° β=93.31 ° γ=109.8 °
Fosfato dicálcico dihidratado (brushita)	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.00	Monoclínico a=5.812 Å b=15.18 Å c=6.239 Å β=116.43 °
Fosfato dicálcico anhidro (monetita)	DCP	CaHPO_4	1.00	Triclínico a=6.9 Å b=6.65 Å c=7 Å α=96.4° β=103.9 ° γ=88.7 °
β-fosfato tricálcico	β-TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50	Hexagonal a=5.248 Å c=18.691 Å
Fosfato tetracálcico	TetCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.00	Monoclínico a=7.023 Å b=11.986 Å c=9.473 Å β=90.9 °
Fosfato octacálcico	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	Triclínico a=19.87 Å b=9.63 Å c=6.875 Å α=89.3°, β=92.2°, γ=108.95°
Hidroxiapatita	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67	Hexagonal a=9.421 Å c=6.882 Å

Aunque la fase termodinámicamente más estable es HAP, una o más de las otras fases, incluyendo apatitas con defectos, pueden encontrarse en diferentes momentos de la precipitación [44]. Por ende, en la precipitación espontánea de fosfato de calcio en soluciones altamente sobresaturadas la formación de apatita es generalmente precedida por la precipitación de una o más fases precursoras, incluyendo el fosfato de calcio amorfo (ACP). La composición de este último parece depender de las condiciones de precipitación y su formación puede ser seguida por la nucleación de OCP, el cual sirve como base para el crecimiento de HAP [44]. Esto se ha demostrado en la mineralización y desmineralización biológica, donde DCPD, OCP y HAP están activamente involucrados [14].

Para explicar la precipitación preferencial de una fase cristalina comparada con otra, puede argumentarse que a menor tensión interfacial o energía libre de borde se espera una fase más soluble [44]. Esto puede resultar en una menor energía libre para nucleación bidimensional, en vez de menor sobresaturación. Está claro que los fosfatos de calcio obedecen la regla de los estados de Ostwald [44], la cual establece que la fase menos estable, con la mayor solubilidad, siempre se formará primero en una reacción de precipitación secuencial. Sin embargo, en estos casos, la secuencia está influenciada también por otro parámetro importante, el pH. Un ejemplo de las isotermas de solubilidad típicas en función de pH se muestra en la figura 1.9.

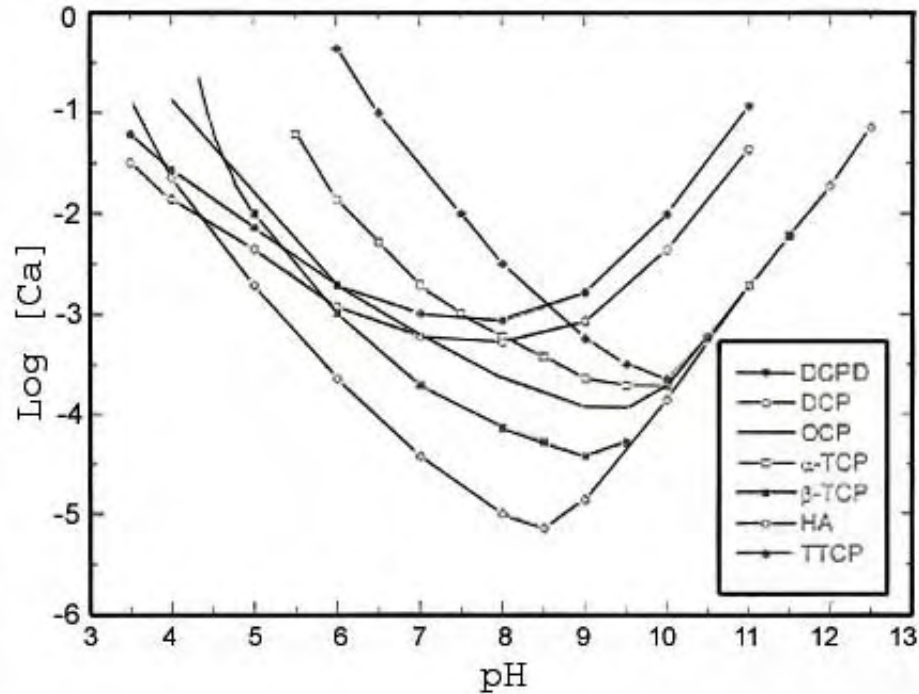


Figura 1.9 Isotermas de solubilidad de diferentes sales de fosfato de calcio, en equilibrio con sus respectivas soluciones. Relación del logaritmo de la concentración de iones Ca contra el pH del medio [45].

En la gráfica se puede ver que por un lado, conforme la acidez de la solución se incrementa, por ejemplo en $\text{pH}=4$, OCP o DCPD pueden ser fases precursoras apropiadas en concordancia con la regla de estados de Ostwald. Por otro lado, aparece que a $\text{pH}\cong 10$, donde la fuerza conductora para HAP es relativamente alta, la participación de más fases ácidas como DCPD y OCP pueden escapar a la regla [44]. Estos son solo algunos ejemplos del comportamiento del sistema [45].

Entonces al igual que el pH, la saturación también es un factor importante. Hasta ahora no se ha observado la formación homogénea de HAP a baja supersaturación, puesto que siempre va precedida por el crecimiento de precursores [14, 44]. Además, se indica que a $\text{pH } 6.7$ se

forma OCP a saturación intermedia y se elimina la presencia de otras fases. Las curvas de crecimiento y tiempos de relajación obtenidos bajo esas condiciones fueron analizados en términos de teorías clásicas de nucleación y crecimiento [44].

De acuerdo con estas teorías, la energía libre de formación de un núcleo estable en el caso de la cristalización homogénea depende del grado de sobresaturación, de la temperatura, de la energía interfacial entre la solución y la partícula y del área superficial de la partícula [44]. Mientras que la energía libre superficial para la nucleación heterogénea está descrita por términos que se refieren a las interfases que envuelven a la partícula cristalina, el sustrato y la fase líquida. Otros parámetros importantes para la formación de partículas, como el tiempo de inducción para la nucleación, el número final de núcleos y la razón de crecimiento de la partícula, también son controlados por la sobresaturación, la energía interfacial y la temperatura [46]. La nucleación heterogénea es favorecida sobre la homogénea si las interacciones entre el núcleo en crecimiento y la superficie del sustrato tienen una energía menor que la energía partícula-solución [46]. Entonces resulta de utilidad manipular las energías a través de variaciones químicas o aditivos con el fin de modificar y controlar la fase cristalina, morfología, hábito cristalino, orientación e incluso quiralidad de un cristal crecido en medio acuoso [46].

La importancia de los niveles de saturación y los efectos de la energía superficial radica en que la fase de fosfato de calcio que se forma

durante la mineralización depende de la sobresaturación relativa con respecto a cada una de las fases de fosfato de calcio [46] y ésta a su vez depende marcadamente del pH en la disolución, cuando las concentraciones molares totales de iones calcio y fosfato son constantes [44]. Esto es especialmente importante en sistemas de biomineralización, donde el pH puede cambiar marcadamente en regiones de remineralización o desmineralización [14].

Además del aspecto termodinámico, también se deben considerar los eventos cinéticos en la construcción de modelos para las diferentes fases de fosfato de calcio, ya que son importantes para determinar cual fase será observada bajo determinadas condiciones. Por ejemplo, la cinética de formación de OCP ha sido descrita como una nucleación tipo flash en combinación con una nucleación de superficie y la forma de crecimiento se basa en un modelo de crecimiento mononuclear.

Recientemente se ha demostrado que las razones molares de los iones en la disolución pueden influenciar marcadamente las razones de mineralización y desmineralización [47]. Los cambios en la actividad superficial, como la disminución del número de dislocaciones, pueden reducir también las razones de reacción incluso aunque los grados de baja o sobre saturación se mantengan constantes. Es importante considerar todos estos elementos debido a su repercusión en los sistemas para precipitar fosfatos de calcio.

1.5.2 HIDRÓLISIS

En la literatura se propone que el OCP puede formar HAP por cualquiera de dos mecanismos, el primero es la hidrólisis *in situ* de OCP y el segundo la disolución de OCP seguida de precipitación de HAP [13]. Así mismo, se tienen reportes de que la hidrólisis de OCP a HAP puede ocurrir tanto por la disolución de OCP seguida por precipitación de HAP, como por una transformación directa de estado sólido [13, 48]. Este apartado se enfoca solo en el primer proceso.

Básicamente la hidrólisis resulta posible por la disociación electrolítica de la molécula de agua, pues esto le permite reaccionar con los aniones o cationes de otros compuestos a su vez disociados, dando lugar a reacciones ácidas o básicas de la solución acuosa [49]. Entre las sustancias que pueden sufrir esta reacción se encuentran numerosas sales, que al ser disueltas en agua, sus iones constituyentes se combinan con los iones hidronio (H_3O^+) o bien con los iones hidroxilo (OH^-), o incluso con ambos. Esto produce un desplazamiento del equilibrio de disociación del agua y como consecuencia se modifica el valor del pH. Los compuestos reaccionantes y los productos de la hidrólisis pueden ser moléculas neutras, como en la mayoría de reacciones en que intervienen compuestos orgánicos, o iónicas como ácidos, bases o sales [49].

Para el caso particular de la hidrólisis de OCP se proponen dos mecanismos [13]. El primero resulta en la formación de cristalitos de HAP

los cuales son parecidos, morfológicamente hablando, a los de OCP. En el segundo, se propone que una capa de OCP de una celda unitaria de espesor se hidroliza para formar una capa de HAP de dos celdas unitarias de espesor. En este proceso de dos pasos, una capa de OCP precipita de la solución y entonces se hidroliza, pero el ensamble final de las fases es dependiente de la química de la solución.

Algunos autores describen la formación de HAP y OCP como el resultado de la hidrólisis de una celda de OCP que produce una capa de HAP con espesor de dos celdas unitarias [13]. De este modo el cristal de HAP estaría cubierto por una capa hidratada conformada por una celda unitaria de OCP. Este modelo está fundamentado en la observación de un defecto central en muchos cristales de apatita, el cual ha sido atribuido a la presencia de OCP [5].

Al ser hidrolizado, el OCP forma una fase de tipo apatita con una razón Ca/P menor a la de HAP estequiométrica [13]. Tanto la transformación de OCP como el crecimiento simultáneo de ambas fases pueden producir una fase apatítica deficiente de calcio [5]. La transformación probablemente nunca será completa, dejando regiones no hidrolizadas de OCP asociadas con la apatita precipitada.

A partir de un análisis más detallado de datos experimentales se propuso que una típica apatita biológica está formada por la precipitación inicial de OCP, el cual hidroliza a una fase intermedia denominada “fosfato octacálcico hidrolizado” (OCPH) [5, 48]. Se pensó que esta fase estaba

formada por capas de ambas estructuras, tipo OCP y tipo HAP, e incluía impurezas y vacancias. Para apoyar este modelo los estudios de MET de cristales de OCP hidrolizados indican el crecimiento adyacente de ambos cristalitas de OCP y HAP lo cual podría ser muy bien descrito en términos de una fase OCPH [5]. Además, los defectos cristalinos e impurezas podrían ser mantenidos en la estructura apatítica, puesto que la hidrólisis de la fase termodinámicamente más estable es irreversible. El producto final sería entonces una fase de apatita, pobremente cristalina y deficiente de calcio [13].

2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

Este apartado se enfoca principalmente en las técnicas de difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de transmisión (MET).

2.1 DIFRACCION DE RAYOS X

La DRX es esencial para este trabajo de investigación, ya que con ella se puede obtener información que permite conocer características importantes de la estructura cristalina del material, como son: identificación de las fases que componen la muestra, identificación de planos, determinación de parámetros de red y tamaño promedio de cristal. Con esta técnica es posible identificar la pureza de la fase y los componentes del material. Además, se emplea el método de Rietveld y el software Full Prof [66] para refinar estructuras cristalinas y observar el efecto de los parámetros que afectan al material, ya sean los relacionados con su preparación o con su tratamiento posterior.

2.1.1 PRINCIPIOS BÁSICOS

En los sólidos cristalinos los átomos se encuentran ordenados y forman arreglos regulares [50]. Estos arreglos se caracterizan por tener una unidad mínima tridimensional llamada celda unitaria. Con esta unidad

mínima se puede generar todo el cristal mediante traslaciones y está compuesta por los diferentes átomos que forman el material. La distribución de los átomos en esta celda unitaria genera las simetrías que caracterizan a la fase cristalina [51].

Cuando un haz de rayos X pasa a través de un material cristalino su distribución espacial cambia. Esto es porque tanto el material como el haz tienen distancias características de dimensiones similares. Al atravesar el material parte del haz no interactúa con los átomos, otra parte es absorbida, y el resto es difractado elásticamente. Esta última fracción de rayos X son los que tienen información sobre el arreglo de los átomos en el sistema que se estudia [52], pues la distribución de las partículas difractadas es discreta y está relacionada con el orden espacial de los átomos que la originaron [53]. Esta distribución de rayos X difractados es la que se emplea para estudiar la disposición atómica en los materiales cristalinos. Además, la difracción de rayos X cumple la ley de Bragg. Es decir, la difracción de rayos X se presenta cuando se satisface $n\lambda = 2d \sin\theta$. Esto implica que la forma en que λ o θ varían durante un proceso generará diferentes métodos de difracción [55,56].

A la par, los materiales cristalinos pueden ser monocristales o policristalinos. En el primer caso, cuando el material consta de un solo cristal, su patrón de difracción de rayos X es un conjunto de puntos. Si se coloca el cristal con uno de sus ejes, o dirección cristalográfica más importante, normal a un haz monocromático de rayos X y se rodea por una película cilíndrica cuyo eje coincide con el eje de rotación del cristal. Al rotar

el cristal, por un instante el plano estará en el ángulo de Bragg adecuado para reflejar el haz monocromático incidente. Esta técnica se conoce como difracción de un monocristal [52-54].

En el segundo caso, cuando el material es policristalino, sus cristales se encuentran orientados al azar respecto al haz incidente. Por lo cual, su patrón de difracción no es un conjunto de puntos discretos, sino que por cada uno de los puntos del monocristal se genera un círculo, cuyo radio corresponde a la distancia entre el centro del patrón y la posición del punto de difracción. Este caso se conoce como difracción de rayos X por el método de polvos [52-54].

Desde el descubrimiento de la difracción de rayos X por materiales cristalinos por M. von Laue [57], se aplicó esta técnica para caracterizar las diferentes fases presentes en un material [58]. En la actualidad se siguen presentando avances en los equipos destinados para este propósito. La figura 2.1 muestra el difractómetro de rayos X empleado en este trabajo.

A partir de que se descubrió que a cada fase cristalina le corresponde solo un difractograma de rayos X, la cristalografía ha tenido un gran desarrollo [58]. Obtener la cristalografía de una fase significa determinar su celda unitaria y la distribución de los átomos en ella. Como resultado del conocimiento generado, se han desarrollado bases de datos que hoy en día se usan para la identificación de las fases presentes en cualquier material [59].



Figura 2.1 *Difractómetro Bruker, modelo D8-Advanced, empleado en el análisis de muestras por difracción de rayos X.*

Cuando se obtiene una nueva fase siempre habrá interés en determinar su estructura cristalina. Así mismo, una vez que se conoce la estructura existe el interés de analizar su evolución con el tratamiento térmico o con otros parámetros que la modifiquen. Conocer el efecto sobre los parámetros de red o las posiciones de los átomos en la celda unitaria o la ocupación de los diferentes sitios es importante para entender muchas de las propiedades de los materiales donde la fase se encuentra inmersa. Todos

estos pequeños cambios pueden determinarse refinando la estructura cristalina.

2.1.2 EL MÉTODO DE RIETVELD

El método de Rietveld es útil para refinar estructuras cristalinas a partir de difracción de rayos X de una muestra policristalina. La técnica produce información cuantitativa detallada de la estructura cristalina de las diferentes fases que forman un material, así como de la concentración, del tamaño promedio de cristal y de las micro-deformaciones en cada fase.

El código desarrollado por Rietveld para el refinamiento [60] fue público en su versión fuente desde un inicio. Esto favoreció que la técnica se implementara con facilidad y que simultáneamente varios grupos de investigación desarrollaran nuevos códigos basados en el Rietveld. De ellos destacan el código DBWS [61], el GSAS [62], el RIETAN [63] y el código XRS-82 [64]. Siguiendo la filosofía de Hugo Rietveld, el Profesor R. A. Young [65] creador del código DBWS, puso a disposición de la comunidad científica el programa fuente de su código, por lo que éste se extendió y se crearon nuevas versiones basadas en él. Algunas de ellas han llegado a ser muy populares, como es el caso del código FULLPROF [66].

Para refinar una estructura cristalina se procede de la siguiente manera. Primero se obtiene el difractograma de rayos X de la muestra que se está analizando. En seguida se identifican todas las fases presentes y se

recaba la información sobre la cristalografía de cada una de ellas. Con esta información cristalográfica y un modelo para el arreglo experimental se calcula un patrón de difracción que se compara con el experimental. Finalmente, los parámetros involucrados en el modelo se modifican, empleando la técnica de mínimos cuadrados, hasta que la diferencia entre el difractograma teórico y el experimental es mínima [59].

El patrón de difracción de la muestra se obtiene con un difractómetro de polvos. Este puede estar basado en la Geometría de Bragg-Brentano [67, 68] o en la geometría de Johansson [69] operando en una configuración $\theta/2\theta$ (la más común) o en una configuración θ/θ , donde θ es el ángulo de difracción. Para disminuir el fondo y con ello simplificar el modelado del difractograma, se emplean monocromadores de rayos X en el haz primario o en el haz secundario. Con la finalidad de tener un gran número de picos de difracción y con ello más restricciones para los parámetros usados al modelar, es recomendable medir el difractograma en el mayor intervalo posible de ángulos, con intervalos típicos de 0.02 grado. El tiempo de medición en cada punto varía entre 2 y 8 segundos por punto, dependiendo de la disponibilidad de tiempo del difractómetro.

Para lograr convergencia, es importante que los valores iniciales de los parámetros involucrados en el modelado sean correctos antes de empezar su refinamiento. Además, se debe seguir un orden apropiado para refinar los parámetros. Los diferentes autores dan rutas para iniciar el refinamiento que a veces difieren entre sí, pero que igualmente producen convergencia [59].

2.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Tanto las imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) como las de MET convencional permiten observar la morfología del material. Con ellas es posible analizar la forma y posición de las partículas, su tamaño, la morfología de los granos y las fronteras de grano.

Además, la MET proporciona información acerca del arreglo estructural y composición química elemental. Empleando las técnicas de MET convencional y MET de alta resolución se pueden identificar las distintas fases presentes en la muestra. Es posible identificar defectos como dislocaciones, fronteras de grano, interfases, precipitados y distorsión debida al esfuerzo. También permite conocer las distancias interplanares. Lo más importante es que proporciona la orientación y las características estructurales de un cristal. Así que, con la MET es posible obtener una descripción global de la microestructura del material por medio de imágenes de las distintas fases, así como sus respectivos patrones de difracción de electrones.

Paralelamente, en muchos casos se vuelve imprescindible el empleo de MET de alta resolución para obtener datos estructurales y morfológicos del material en distintas etapas o debido a sus características. Para llevar a cabo el análisis de las imágenes de alta resolución se cuenta con una gran variedad de programas. En este caso se trabaja con el programa Digital

Micrograph [75] para obtener los patrones de difracción numéricos (transformadas rápidas de Fourier) en las zonas de interés.

2.2.1 GENERALIDADES

Cualquier instrumento que pueda mostrar imágenes que revelen detalles más finos que 0.1 mm puede ser descrito como microscopio y su máxima amplificación útil está limitada por su resolución, que es la distancia más pequeña que puede distinguir entre dos puntos [70]. Al hablar del microscopio de electrones, en algunos casos resulta ilustrativo el uso de analogías con el microscopio óptico, debido a la familiaridad con el concepto de microscopía de luz visible.

Superar el límite de resolución del microscopio óptico, no es la única ventaja del microscopio electrónico. Al interaccionar el haz con la muestra se produce una gran cantidad de señales. Algunas de ellas se resumen en la figura 2.2.

Cada una de ellas, por sus características, proporciona diferentes vías para estudiar un material [71]. Los electrones retrodispersados permiten obtener una imagen topográfica de la muestra, dan información sobre la superficie y además logran distinguir entre fases con diferente composición química, pues la intensidad de estos electrones depende del número atómico del material. Los electrones secundarios se emplean normalmente para obtener una imagen de la superficie de la muestra. Los electrones Auger y

los rayos X característicos dependen de la composición química de la muestra y permiten hacer un análisis químico elemental, cualitativo y cuantitativo, de una o varias regiones de ella. Los electrones absorbidos arrojan información acerca de la resistividad o conductividad eléctrica de la muestra, pues sufren choques e interacciones en el interior de la misma. Los electrones transmitidos y los electrones difractados proporcionan información acerca de la estructura interna de la muestra, pues los primeros pasan a través de ella sin ser desviados de su dirección incidente, mientras que los segundos si son desviados [71].

El análisis de cada una de las señales producidas permite obtener información específica del material, por lo que un microscopio electrónico equipado con los detectores adecuados es una valiosa herramienta de caracterización.

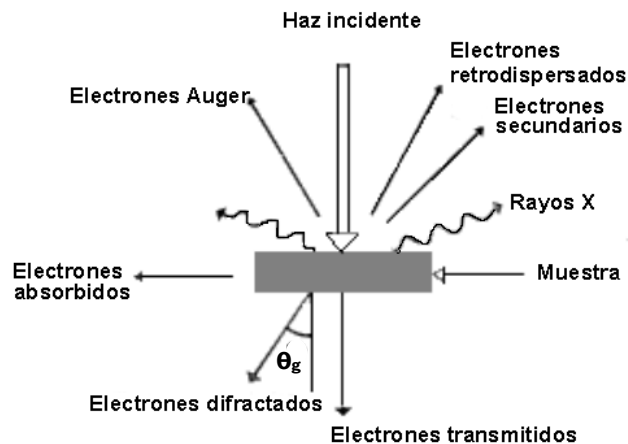


Figura 2.2 Señales producidas por la interacción del haz electrónico con la muestra.

2.2.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El MEB es un instrumento muy útil para la observación y análisis de las características microestructurales, morfológicas y topográficas de materiales sólidos. Además se pueden examinar objetos a muy bajas ampliaciones y permite movimientos en los tres ejes del espacio, lo mismo que las inclinaciones y los giros. De las señales descritas anteriormente, el MEB se sirve de los electrones secundarios y de los retrodispersados, emitidos en un punto de la muestra, los cuales son recolectados por los detectores apropiados para formar las imágenes [71, 72].

La técnica de MEB ha ido evolucionando con el fin de satisfacer las necesidades que se presentan e incrementar su utilidad. Una de las modificaciones importantes con que se cuenta en la actualidad son los sistemas que permiten trabajar en condiciones de presión controlada. Esto representa ciertas ventajas sobre los microscopios de barrido que no cuentan con esa opción [72, 73]. Por ejemplo, la preparación de muestras se vuelve en general más sencilla, se tiene la posibilidad de visualizar muestras de gran tamaño sin importar su espesor y la muestra puede ser no conductora de la corriente eléctrica. Otras modificaciones importantes se dan al acoplar varios sistemas de análisis o detección sin necesidad de adaptaciones o reformas al diseño del microscopio [73]. Esto ofrece la ventaja de obtener más información acerca del material, como por ejemplo, en un MEB donde además se pueden efectuar microanálisis de rayos X.

El microscopio electrónico de barrido empleado en este trabajo se muestra en la figura 2.3.



Figura 2.3 Microscopio electrónico de barrido modelo JEOL 5600-LV empleado en el análisis de muestras por MEB.

2.2.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Como se mencionó anteriormente, la similitud entre el proceso físico de la formación de imágenes en el microscopio electrónico y el microscopio óptico hizo posible su rápido desarrollo. El diagrama de la figura 2.4 es útil para ejemplificar la formación de imágenes y patrones de difracción en el MET. Observe que los electrones transmitidos son captados por la lente

objetiva y se produce una primera imagen, la cual sirve como objeto para la lente intermedia, que generará una segunda imagen. Ésta a su vez es ampliada por la lente proyectora para obtener la imagen final, en la pantalla o en una placa fotográfica [70, 71]. De acuerdo con la distancia a la que se coloquen las lentes, ya sea en el plano focal o en el plano imagen, se puede obtener el patrón de difracción o la imagen de la muestra.

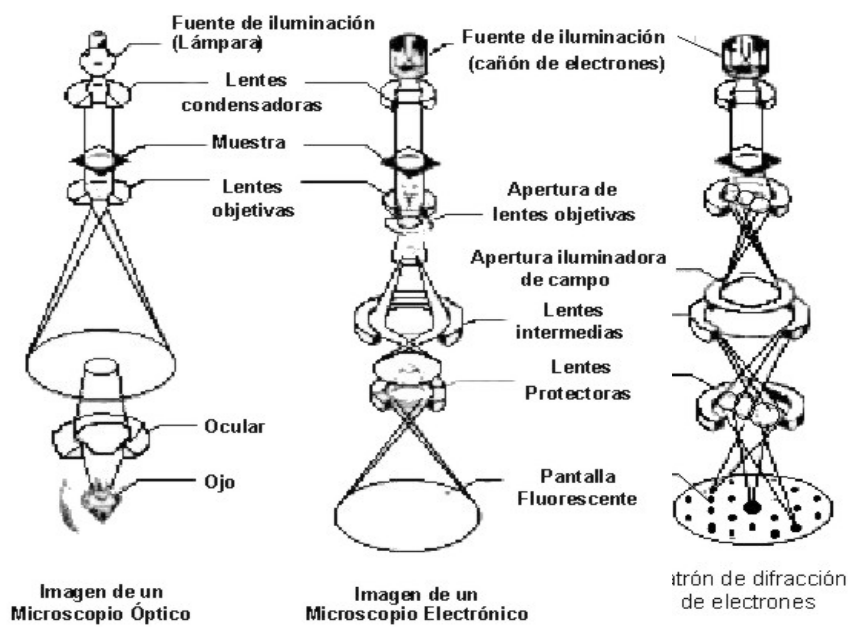


Figura 2.4 Formación de imágenes del microscopio óptico y del microscopio electrónico.

El patrón de difracción contiene electrones de toda el área de la muestra que se ilumina con el haz, sin embargo es de mayor utilidad seleccionar solo un área específica que contribuya al patrón de difracción y reduzca su intensidad [70]. Esta operación recibe el nombre de difracción de área selecta. Sin importar el tipo de muestra el patrón de difracción contiene

un punto central brillante y otros puntos difractados, como se muestra en el esquema de la figura 2.5, los cuales se utilizan para crear las dos operaciones básicas de imagen en MET.

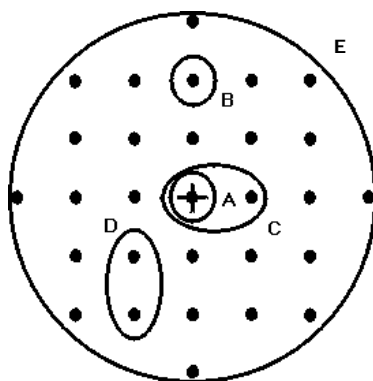


Figura 2.5 Patrón de difracción de área selecta. Útil para la formación de imágenes de campo claro y campo oscuro. Respectivamente, A) y B) en condición de un haz. C) y D), en condición de dos haces. E) Alta resolución.

Cuando se forman imágenes en el MET puede utilizarse solo el punto central o bien, utilizar uno o más de los puntos difractados [70]. Al seleccionar solo el punto central (figura 2.5A) la imagen que resulta recibe el nombre de imagen de campo claro. Si se toma solo alguno de los difractados (figura 2.5B) se llamará imagen de campo oscuro. En este caso se tienen imágenes “en condición de un haz”. Esto puede aplicarse también al tomar más de un punto. Por ejemplo, se habla de condición de dos haces cuando se utilizan dos de los puntos del patrón de difracción. Entonces se toma el haz transmitido y uno difractado para formar imágenes de campo claro (figura 2.5C) y dos haces transmitidos para imágenes de campo oscuro (figura 2.5D).

De esta forma las imágenes de campo oscuro indican las regiones de la muestra que están contribuyendo a los diferentes haces difractados [71].

Las imágenes de alta resolución se obtienen cuando se utilizan todos los puntos del patrón de difracción, incluyendo el transmitido. La imagen formada es el resultado de la información obtenida de los “n” haces (círculo E de la figura 2.5).

Adicionalmente, con el objeto de estudiar estructuras cristalinas por medio de la interpretación de los patrones de difracción, se ha desarrollado el concepto de espacio recíproco [74]. De esta forma, a toda estructura cristalina se le asocian dos redes: la de Bravais y la red recíproca. Ambas están relacionadas por las definiciones:

$$a_1^* = \frac{2\pi(a_2 \times a_3)}{V} \quad (2.1)$$

$$a_2^* = \frac{2\pi(a_3 \times a_1)}{V} \quad (2.2)$$

$$a_3^* = \frac{2\pi(a_1 \times a_2)}{V} \quad (2.3)$$

Donde $V = a_1 \bullet (a_2 \times a_3)$ es el volumen de la celda unitaria.

Dos propiedades fundamentales de la red recíproca son:

1. Todo vector \mathbf{g} de la red recíproca de coordenadas hkl es perpendicular a la familia de planos (hkl) de la red directa, cuyos índices de Miller son precisamente los enteros h, k, l .
2. El módulo de un vector \mathbf{g}_{hkl} de la red recíproca es inversamente proporcional a la distancia interplanar d_{hkl} .

Si \mathbf{K}_0 es el vector de onda del haz de electrones que incide sobre uno de los puntos de la red y \mathbf{K} el haz dispersado, la condición para que exista diferencia constructiva, conocida como condición de Laue, es:

$$\mathbf{K} - \mathbf{K}_0 = \mathbf{g} \quad (2.6)$$

donde \mathbf{g} es un vector de la red recíproca.

Entonces, el patrón de difracción es una “sección” del espacio recíproco. La construcción de Ewald (figura 2.6) explica de forma sencilla esta situación.

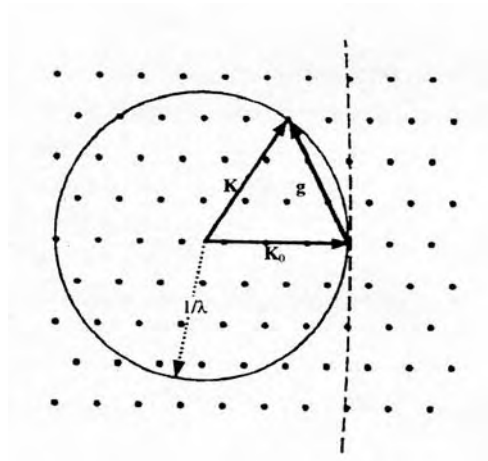


Figura 2.6 Construcción de la esfera de Ewald en el espacio recíproco.

Si \mathbf{K}_0 y \mathbf{K} son, respectivamente, las direcciones del haz electrónico incidente y del haz dispersado, los vectores \mathbf{g} que satisfacen la condición de Laue se encuentran sobre la esfera de Ewald de radio $k = 1/\lambda$. La regla para saber las direcciones de los haces difractados se reduce entonces a buscar la intersección de la esfera de Ewald con la red recíproca [74]. Por ejemplo, para 100kV, los electrones presentan la longitud de onda de $\lambda=0.038\text{\AA}$, por lo que la curvatura de la esfera de Ewald es muy pequeña, prácticamente un plano,

tal y como se observa en la figura 2.6, y se puede registrar un conjunto grande de reflexiones que pertenecen a un plano de la red recíproca [71, 74].

Por último, se debe tener en cuenta que para utilizar esta técnica, la muestra debe cumplir con características especiales como ser representativa, delgada y estable a la radiación de electrones [70]. Los microscopios electrónicos de transmisión utilizados en este trabajo se muestran en la figura 2.7.

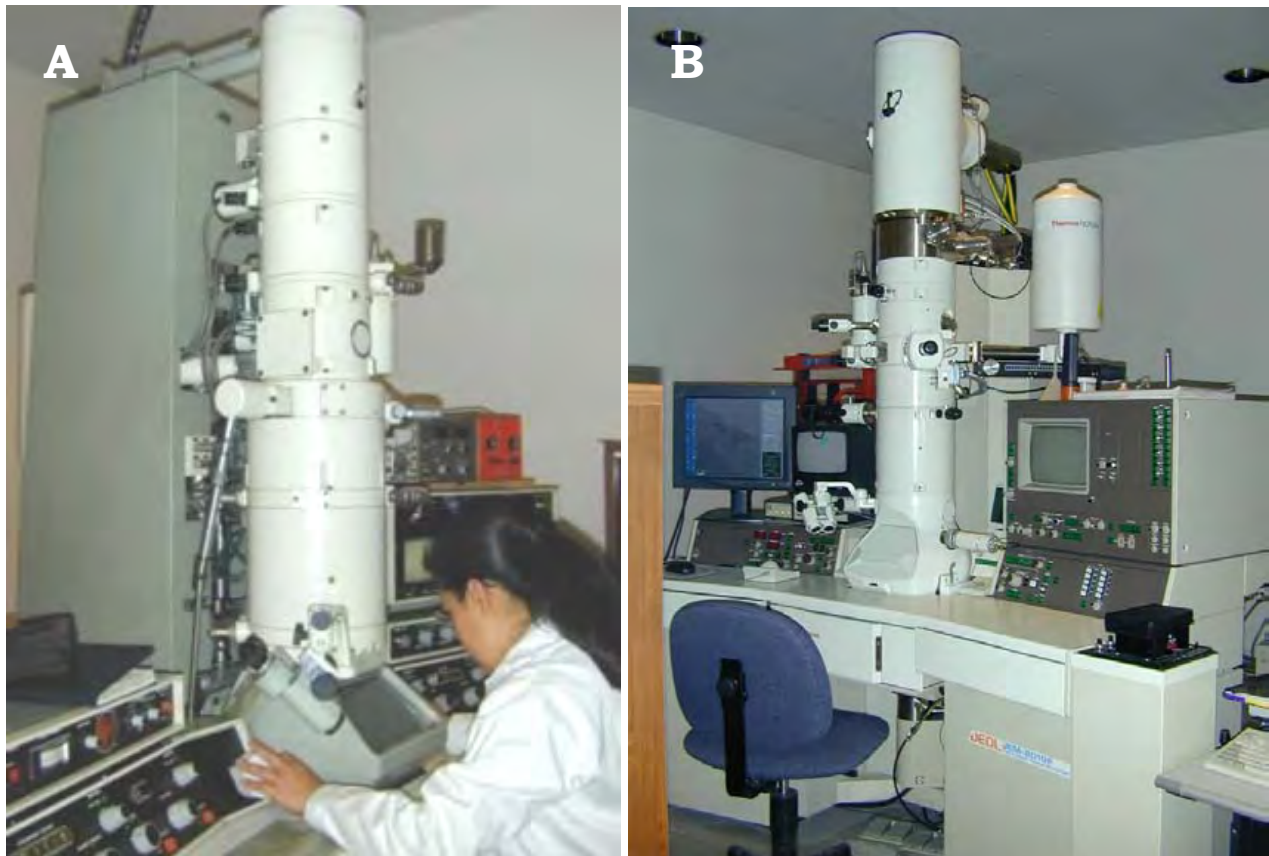


Figura 2.7 A) Microscopio electrónico de transmisión modelo JEOL 100CX empleado en el análisis de muestras por MET convencional. B) Microscopio electrónico de transmisión modelo JEOL FEG2010 empleado en el análisis de muestras por MET de alta resolución.

2.2.4 ANÁLISIS DE IMÁGENES DE TEM DE ALTA RESOLUCIÓN

Existen diversos programas que se emplean para analizar las imágenes obtenidas por MET de alta resolución [70]. En este caso se emplea el programa Digital Micrograph de la compañía Gatan [75]. Este programa permite realizar el procesamiento de imágenes, hacer mediciones directas de la imagen y obtener su transformada rápida de Fourier (patrones de difracción numéricos) en zonas de interés.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental de este trabajo se divide en cuatro pasos principales. Inicialmente se llevó a cabo la síntesis de OCP por medio de técnicas de precipitación. Una vez obtenido el OCP, se caracterizó por difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de transmisión (MET) para determinar su estructura. Posteriormente, el OCP fue hidrolizado a diferentes intervalos de tiempo para producir una fase hidrolizada (OCPH) y finalmente HAP. Por último se llevó a cabo la caracterización estructural de las fases involucradas en el proceso de hidrólisis por medio de DRX, MET convencional y MET de alta resolución. La descripción detallada de los procesos se da a continuación.

3.1 PRODUCCIÓN DE OCP

Para llevar a cabo la síntesis de OCP se revisaron los antecedentes e información relativa a cada una de las fases y se realizaron ensayos previos para determinar las condiciones más favorables de obtención. En este caso se decidió trabajar con el método de precipitación [76]. Esencialmente, el OCP se obtuvo por adición de 250 mL de una disolución de acetato de calcio ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) de concentración 0.04M en 750 mL de una disolución de fosfatos que contenía 5 mmol de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) y 5 mmol de fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4). El proceso se llevó a cabo con agitación constante, a temperatura controlada de 60 °C y con un pH

inicial de 5. Una vez precipitado el material se decantó y se lavó con agua destilada. Finalmente fue secado a 40 °C para obtener el polvo. En la figura 3.1 se observa el esquema del procedimiento.

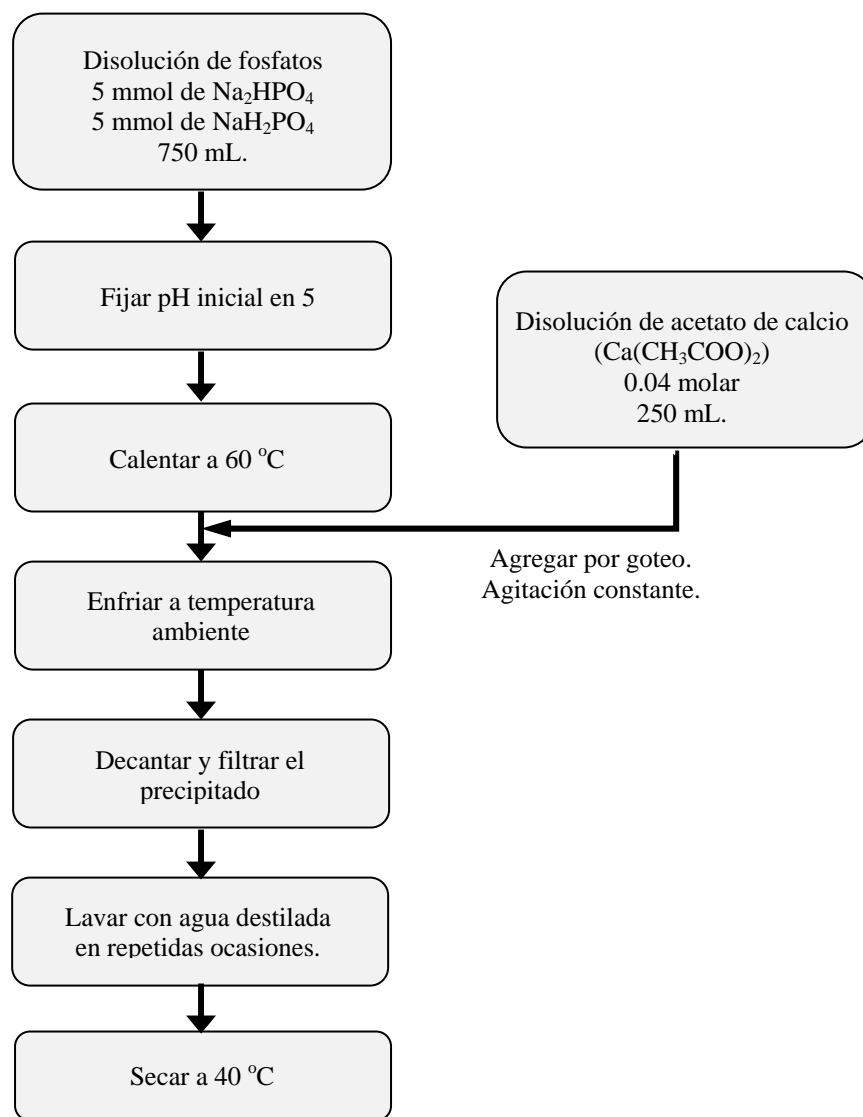
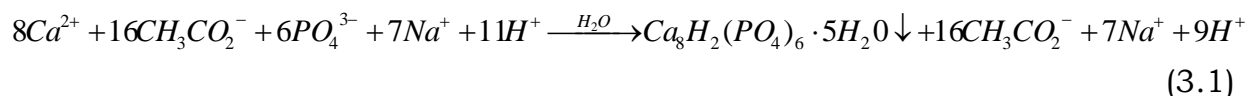


Figura 3.1 Esquema del procedimiento para la obtención de OCP por precipitación.

La reacción de precipitación propuesta para este proceso está indicada en la ecuación 3.1, donde se observa la relación estequiométrica que guardan las especies adicionadas al inicio para dar como resultado la precipitación de OCP bajo las condiciones adecuadas.



3.2 CARACTERIZACIÓN DE OCP

Las muestras del polvo obtenido fueron analizadas por DRX, MEB y MET para determinar sus características estructurales.

Se realizaron análisis de DRX al polvo obtenido por precipitación para corroborar sus características por medio de sus parámetros de red e identificación de planos, así como descartar la presencia de otras fases. El estudio de las muestras se llevó a cabo en el difractómetro Bruker modelo D8-Advanced usando radiación monocromática de $Cu_{(K\alpha)}$ ($\lambda=0.154$ nm) y un detector de área “Linxeye”. Los espectros de difracción fueron escaneados entre 3° y 110° con un tamaño de paso de 0.02° (2θ) y con un tiempo por paso de 162 segundos, usando la geometría de Bragg-Brentano.

Para determinar parámetros de red, el tamaño de cristal y el porcentaje de las fases en las muestras, las estructuras cristalinas fueron refinadas a partir de los difractogramas de rayos X utilizando el método de Rietveld y el programa FullProf [66].

Se recurrió a MEB para observar la morfología del material obtenido. Se trabajó con el microscopio de barrido JEOL modelo 5600LV, que cuenta con cámara de presión controlada, en las siguientes condiciones: voltaje de 20 kV, presión de cámara a 20 Pa, y señal de electrones retrodispersados. Para tal efecto, la muestra simplemente fue adherida con cinta de carbono a un portamuestras de aluminio y no se requirió agregar sobre ella alguna película conductora como recubrimiento.

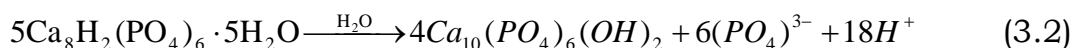
Se empleó la MET convencional y de alta resolución para analizar las características estructurales que presenta el polvo de OCP. Previo al trabajo en el microscopio, se preparó la muestra de la siguiente forma. El polvo fue molido en un mortero de ágata y tamizado con una rejilla de 325 mesh ($\leq 44\mu\text{m}$). El polvo así obtenido fue soportado sobre rejillas de cobre previamente recubiertas con una película plástica y una de carbono. Una vez colocado el polvo sobre las rejillas se recubrieron nuevamente con una película de carbono de aproximadamente 20 nm de espesor para minimizar tanto el daño producido por el haz electrónico como los efectos de carga sobre la muestra durante la observación de los granos.

Para las observaciones de MET convencional fue utilizado el microscopio JEOL-100CX, en los modos de imagen de campo claro, campo oscuro y patrón de difracción de área selecta. Para las observaciones de MET de alta resolución se empleó el microscopio JEOL FEG2010. Para el procesamiento digital de las imágenes y las mediciones estadísticas se empleó el software Digital Micrograph de GATAN [75].

3.3 HIDRÓLISIS DE OCP

Una vez caracterizado el OCP, el paso siguiente era producir la fase hidrolizada hasta obtener HAP. Para esto se tomaron como referencia principal algunos de los experimentos reportados acerca de la hidrólisis de OCP para obtener OCP hidrolizado (OCPH) [13]. El análisis se basó en tres sistemas. El primero propone OCP con hidróxido de calcio, ambos en cantidades estequiométricas. En el segundo, OCP con fosfato tetracálcico igualmente en cantidades estequiométricas. En el tercero se planteó la hidrólisis directa de OCP. A partir de los resultados obtenidos se encontraron diferencias significativas en el tiempo total de transformación de OCP en HAP. Además, en los dos primeros casos se observaron restos de los precursores o fases intermediarias. Con base en esto se determinó que la hidrólisis directa provee un proceso más limpio y con menor consumo de tiempo para lograr la transformación de OCP en HAP.

La ecuación 3.2 expresa la reacción propuesta para la hidrólisis directa de OCP.



Para llevarla a cabo, se colocaron 100 mg del OCP obtenido por precipitación y previamente caracterizado en 100 mL de agua bidestilada, dentro de un matraz de dos bocas equipado con un condensador y un termómetro. El sistema se mantuvo en reflujo a 60 °C por 30 minutos. Al

final el material fue filtrado, lavado con agua destilada y secado a 40 °C. Se registró el valor inicial y final de pH en el medio a temperatura ambiente. El proceso fue repetido a diferentes intervalos de tiempo, por 1, 6 y 12 horas para finalmente comparar los resultados. En la figura 3.2 se observa el esquema del procedimiento.

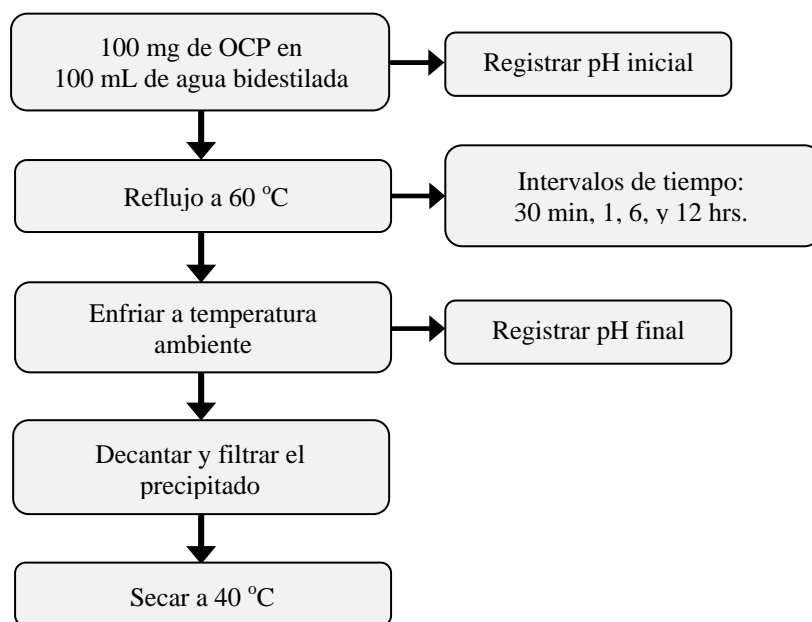


Figura 3.2 Esquema del procedimiento para la hidrólisis de OCP.

3.4 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL HIDROLIZADO

Las muestras de polvo hidrolizado obtenidas en los diferentes intervalos de tiempo fueron analizadas por DRX, MEB, MET convencional y de alta resolución para determinar sus características estructurales.

El análisis de DRX se realizó al polvo obtenido en cada uno de los intervalos de tiempo para comparar el efecto de la hidrólisis sobre la fase de

OCP, para comprobar si se obtenía la fase de HAP al final del proceso y para observar si se formaba alguna otra fase durante el mismo. El análisis de las muestras se llevó a cabo en el mismo equipo y bajo las mismas condiciones que para el OCP. De igual forma, las estructuras cristalinas fueron refinadas utilizando el método de Rietveld y el programa FullProf [66] siguiendo el procedimiento utilizado en el caso de una sola fase.

Se utilizó el MEB para observar los cambios en la morfología del material después de haber sido hidrolizado. Las muestras fueron preparadas y observadas en las mismas condiciones que el polvo de OCP.

Para analizar las características estructurales que presenta el polvo de OCP después de ser sometido al proceso de hidrólisis, así como el efecto del tiempo en el mismo, se empleó la MET convencional y de alta resolución. El proceso de preparación de las muestras fue semejante al que se describió para el precipitado de OCP. Así mismo, se trabajó en los microscopios JEOL-100CX y JEOL FEG2010, bajo las mismas condiciones de operación de cada uno de ellos. El procesamiento digital de las imágenes y las mediciones estadísticas se realizaron con el software Digital Micrograph de GATAN [75].

Además se aprovecharon los modelos simulados de las celdas y de los patrones de difracción de electrones realizados con el programa Electron Microscopy Image Simulation (EMS) para OCP y HAP [77]. Este software fue desarrollado para el análisis y simulación de las imágenes de TEM de alta resolución y de sus patrones de difracción.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN DE OCP

Como se describió en el capítulo anterior, la etapa inicial del trabajo es la síntesis de OCP por medio de precipitación, seguida de la caracterización del mismo para determinar su estructura.

De acuerdo con la información recabada acerca de las fases, el proceso para llevar a cabo la síntesis de OCP requirió de un cuidadoso control de las variables involucradas, principalmente del pH, ya que pequeñas variaciones en este parámetro generaban cambios significativos en la fase que precipitaba.

Una vez seco el material, se obtuvo el polvo. Éste puede describirse como un polvo de color blanco, opaco, suave, formado por aglomerados y ligeramente higroscópico. En la figura 4.1 se observan algunas etapas del procedimiento para obtener el OCP por precipitación.

Ya obtenido el material en polvo, se observaron las muestras por microscopía electrónica de barrido y se analizaron por difracción de rayos X para corroborar que se obtuvo la fase de OCP. Además se analizaron por microscopía electrónica de transmisión para determinar sus características estructurales y se compararon los correspondientes patrones de difracción de electrones, experimentales y simulados, para la confirmación de los resultados.

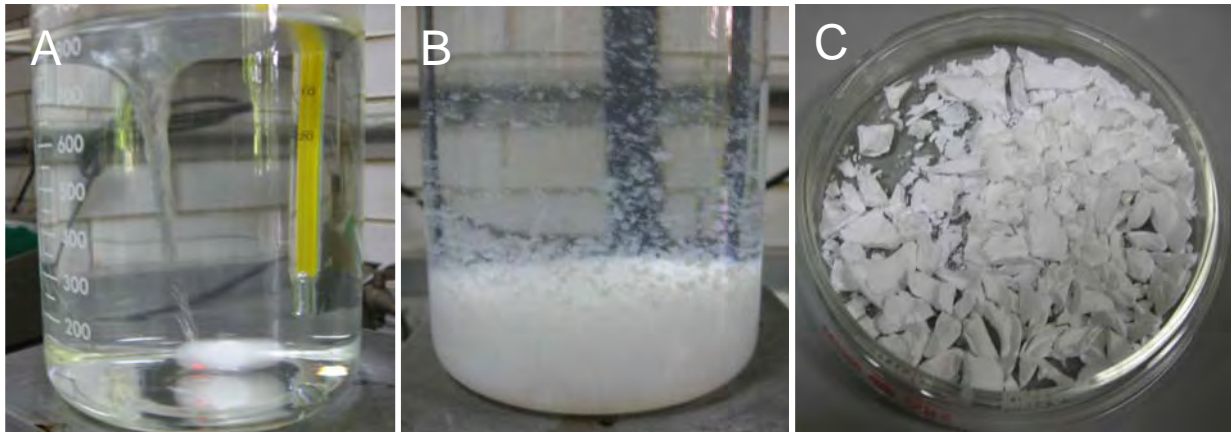


Figura 4.1 Obtención de OCP por precipitación. A) El valor del pH al inicio del proceso es de gran importancia para controlar la fase que precipita. B) El precipitado se deposita en el fondo, después de unos minutos se decanta para filtrarlo y lavarlo. C) Después de secarlo, el resultado final es un polvo suave de color blanco.

4.1.1 MEB

Se utilizó el MEB para observar la morfología del material obtenido. La figura 4.2 muestra la imagen de MEB del polvo obtenido por precipitación. En ella se observa que el polvo está formado por aglomerados y éstos a su vez por granos aciculares de aproximadamente $1\mu\text{m}$ de longitud. Este tipo de morfología se observó en todos los lotes de material que fueron producidos.

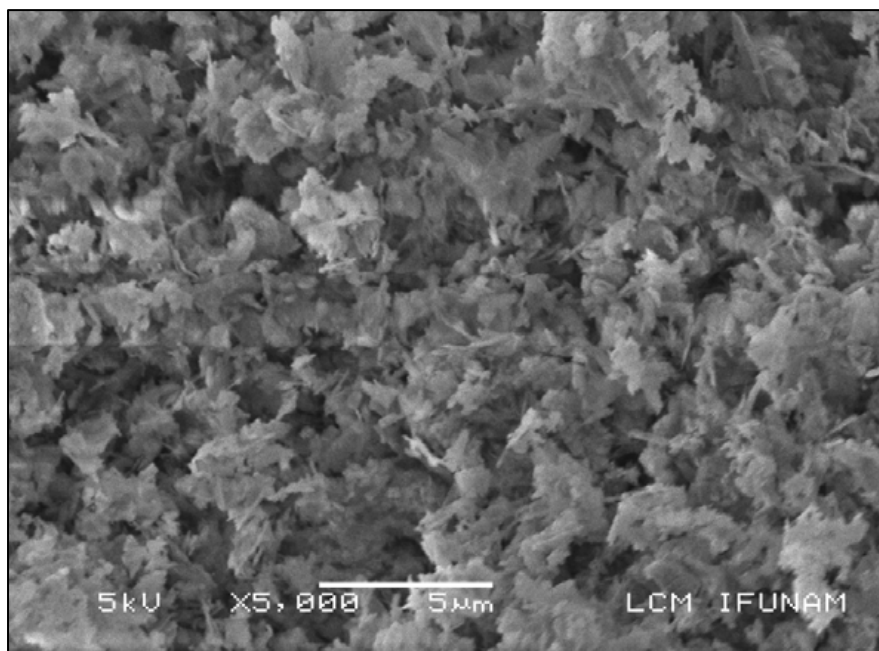


Figura 4.2 Imagen de MEB del polvo de OCP obtenido por el proceso de precipitación. Se observa que está formado por granos aciculares de 1µm.

4.1.2 DRX

Posteriormente se analizó el polvo por DRX para determinar sus características por medio de sus parámetros de red e identificación de planos, así como descartar la presencia de otras fases. Los espectros obtenidos indican que el material corresponde a la fase OCP. En este análisis se observó claramente que cuando el valor de pH de la disolución tenía variaciones aparecían otras fases de fosfato de calcio, como brushita, acompañando al OCP. La figura 4.3 muestra el difractograma de rayos X del polvo que corresponde únicamente a la fase de OCP, cuya indexación se llevó a cabo con la tarjeta PDF #44-0778.

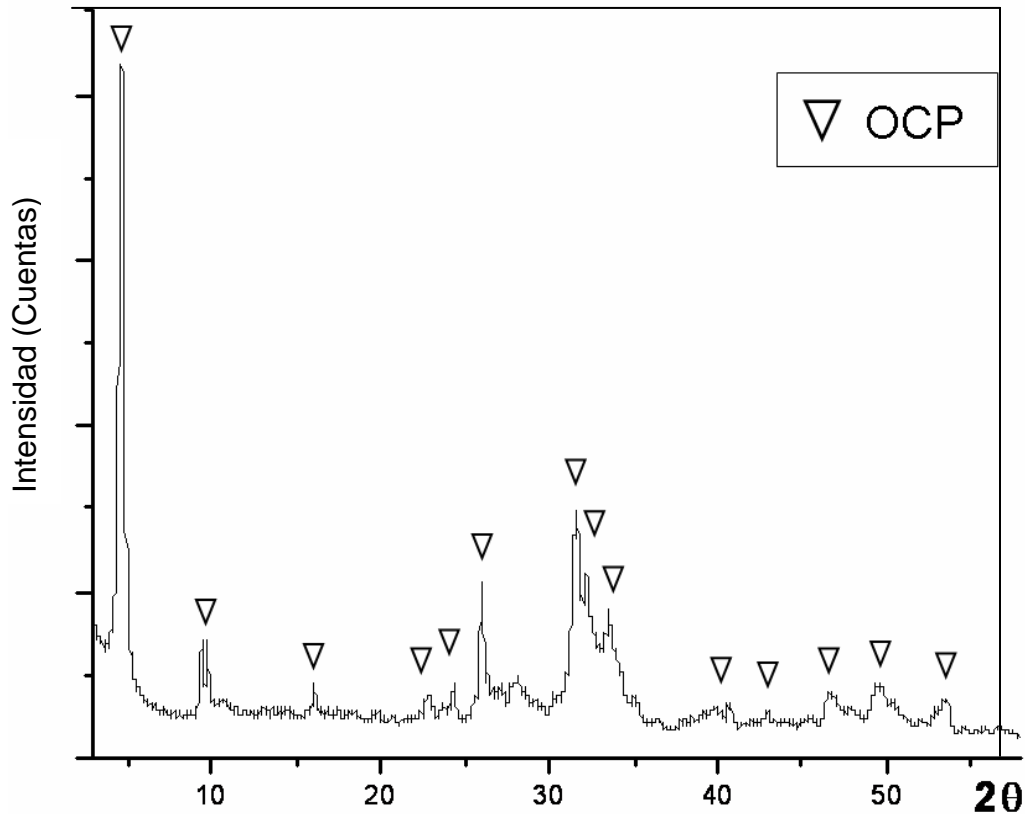


Figura 4.3 Difractograma de rayos X del polvo mostrado en la figura 3.1C. La indexación muestra que corresponde a OCP (PDF #44-0778).

Es importante hacer notar que el OCP tiene varias tablas de PDF. Las principales diferencias entre los parámetros reportados por cada una se aprecian en la tabla 4.1. En una de ellas, el caso de la tarjeta PDF #26-1056, los datos cristalográficos están intercambiados respecto a los otros reportados y tiene un cambio significativo en el valor del ángulo gama.

Para este trabajo se tomaron como base los datos del PDF #44-0778, el cual está en concordancia con los datos reportados para OCP y se ajusta de manera más cercana a los valores de intensidad y posición de las reflexiones

obtenidas del material precipitado. Algunos otros investigadores [43] usan el PDF#79-0423, que presenta algunas variaciones en los datos.

Tabla 4.1
Datos cristalográficos del fosfato octacálcico.

PDF	Características	Parámetros de red
26-1056	Radiación=Cu; $\lambda=1.54056$ $2\theta=4.722-52.454$ Ref: Natl. Bur. Stand. (U.S.A) Monogr. 25, v13 p21 (1976). T=25 °C. Elaborado por Brown, W. E.	a=0.953, b=1.899, c=0.6855 nm $\alpha=92.3^\circ$, $\beta=90.13^\circ$, $\gamma=79.93^\circ$
44-0778	Radiación=CuK α 1; $\lambda =1.5406$ $2\theta=4.747-49.496$ Ref: Level-1 PDF. Brown, W. E.	a=1.987, b=0.963, c=0.6875 nm $\alpha=89.3^\circ$, $\beta=92.2^\circ$, $\gamma=108.95^\circ$
74-1301	Radiación=CuK α 1; $\lambda =1.5406$ $2\theta=4.701-43.602$ Ref: Calculado	a=1.987, b=0.963, c=0.6875 nm $\alpha=89.3^\circ$, $\beta=92.2^\circ$, $\gamma=108.95^\circ$
79-0423	Radiación=CuK α 1; $\lambda =1.5406$ $2\theta=4.738-44.443$ Ref: Level-1 PDF	a=1.969, b=0.952, c=0.6835 nm $\alpha=90.1^\circ$, $\beta=92.5^\circ$, $\gamma=108.65^\circ$

4.1.3 REFINAMIENTO DE LA ESTRUCTURA POR EL MÉTODO DE RIETVELD

La estructura cristalina de OCP fue refinada tomando como base el difractograma de rayos X obtenido e identificado con la ficha 44-0778. La cristalografía se complementó con las coordenadas atómicas reportadas en la base ICSD número 27050 que integra los datos cristalográficos reportados para dicha tarjeta de PDF. A partir de ellos se realizó el modelado de la

estructura y se trabajó principalmente sobre los parámetros relacionados con la forma del cristal. En la figura 4.4 se muestra la gráfica de Rietveld que resulta al refinar la estructura cristalina del OCP. El difractograma experimental se indica con cruces y el calculado con una línea continua. En la parte inferior de la figura se puede apreciar el ajuste entre ambos por medio de su diferencia y las barras verticales indican las posiciones de los picos, calculadas usando los parámetros de la red y la simetría de la celda unitaria. Después del refinamiento los parámetros de red calculados para OCP fueron: $a=1.970$, $b=0.950$, $c=0.685$ nm; $\alpha=90.03^\circ$, $\beta=92.48^\circ$, $\gamma=108.32^\circ$, que concuerdan con el sistema triclinico P-1 y el tamaño promedio de cristal fue de 45.2 ± 0.6 nm.

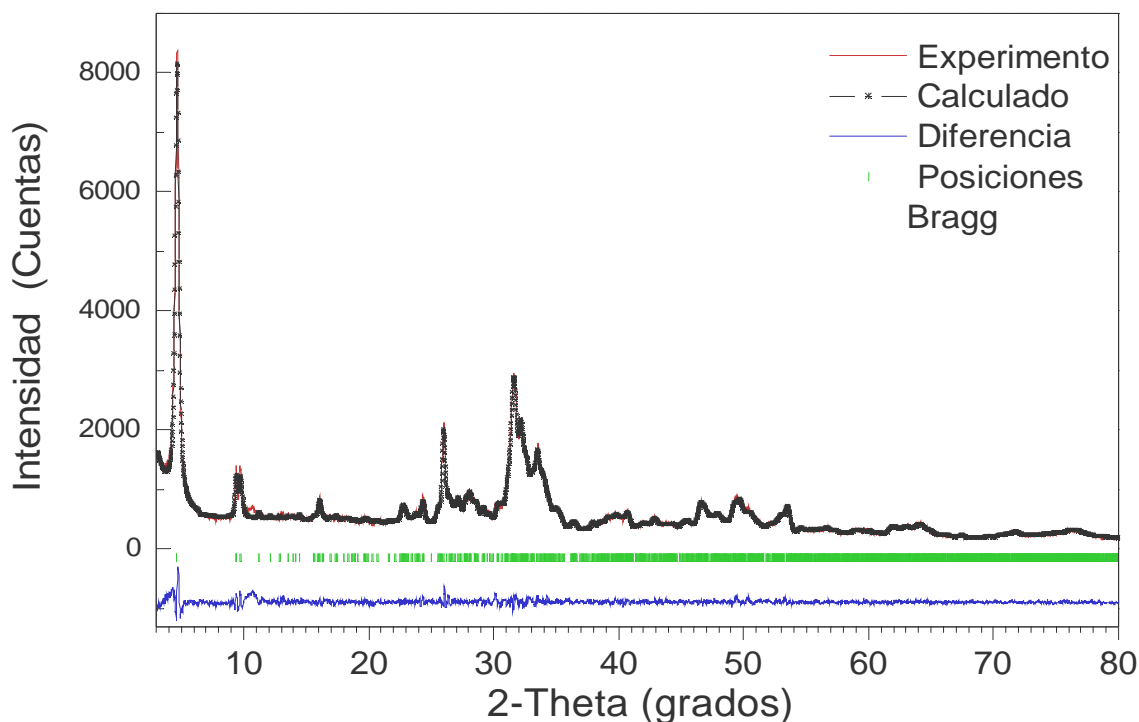


Figura 4.4 Espectro refinado de OCP obtenido por el método de Rietveld.

4.1.4 MET

Por otro lado, se realizó el análisis de las características estructurales que presenta el polvo de OCP por medio de MET convencional y MET de alta resolución. En el primer caso se utilizaron los modos de imagen de campo claro, campo oscuro y patrón de difracción de área selecta para la observación. La figura 4.5 muestra un juego de imágenes de campo claro y campo oscuro donde se puede apreciar que en general el material está conformado por granos de forma acicular que tienen una dimensión menor a $0.5 \mu\text{m}$. Este tipo de imágenes también permite reconocer que el material es homogéneo, pues al obtener la imagen de campo oscuro a partir de alguna de las reflexiones del patrón de difracción de área selecta se puede apreciar la uniformidad del material, es decir que, en el caso de la figura 4.5b, la zona brillante indica que la fibra está formada por el mismo material. Esto puede observarse también en las figuras 4.6a y 4.6b. Los patrones de difracción de área selecta que se obtuvieron fueron analizados para confirmar que las distancias y los ángulos encontrados correspondían a la fase. En la figura 4.6c se observa el patrón de difracción característico del material, el cual se encontró en repetidas ocasiones y cuya indexación corresponde al eje de zona [110] de la celda unitaria de OCP.

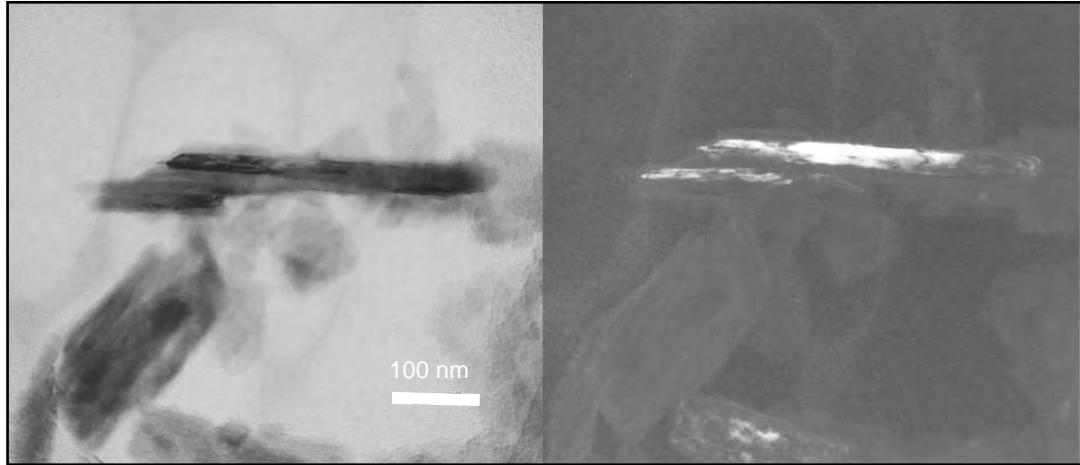


Figura 4.5 Imágenes de MET de los granos del polvo. A) Campo claro. B) Campo oscuro. Se observa que en general está formado por granos aciculares de tamaño menor a $0.5\mu\text{m}$.

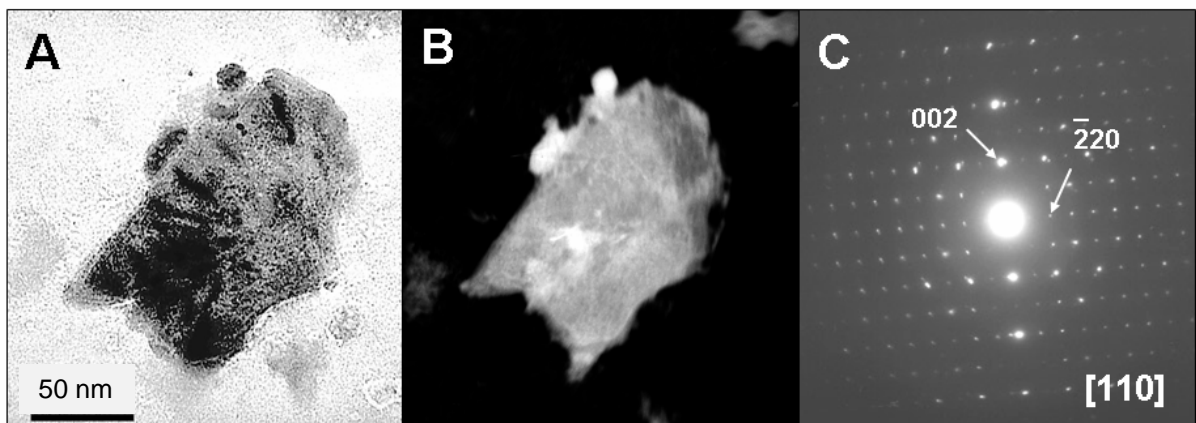


Figura 4.6 Imágenes de MET de uno de los granos del polvo. A) Campo claro. B) Campo oscuro. C) Patrón de difracción de área selecta a los largo del eje de zona $[110]$ de la celda unitaria de OCP.

Las imágenes de alta resolución también permitieron estudiar la estructura del polvo para determinar si correspondía con OCP. En la figura 4.7a se muestra la imagen obtenida experimentalmente y la transformada rápida de Fourier (FFT), ubicada en la parte superior izquierda, que se realizó

a la zona indicada con el recuadro en blanco. Para el mismo recuadro, se realizó el procesamiento de imagen que se muestra en 4.7b. En la imagen procesada se midieron las distancias entre planos para compararlas con las de OCP y se encontró que sí correspondían a la fase. Finalmente con esta información y con los patrones simulados de la figura 1.3 se determinó que el arreglo que se observa en la figura 4.7 corresponde al eje de zona $[\bar{1}10]$. Siguiendo este procedimiento para diferentes partículas se confirmó que la estructura del material corresponde a la estructura de OCP.

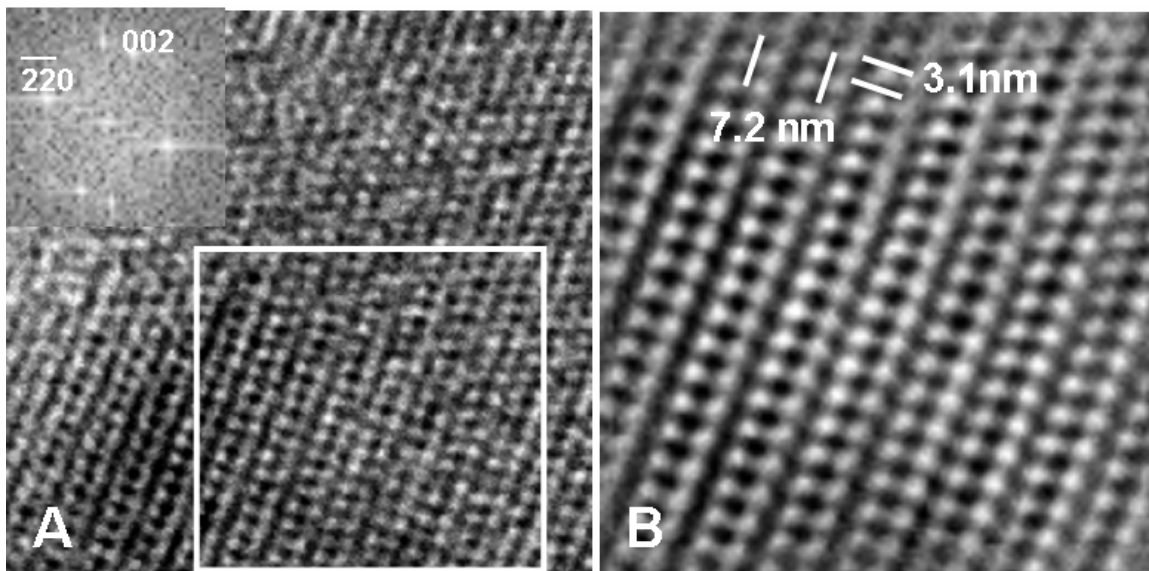


Figura 4.7 A) Imagen de HRTEM de uno de los granos del polvo de OCP y la FFT del área enmarcada que corresponde con el eje de zona $[\bar{1}10]$ de OCP. B) Imagen procesada del área indicada por el recuadro en (A).

4.2 CARACTERIZACIÓN DE OCP HIDROLIZADO

El OCP caracterizado en la sección anterior fue el material base para llevar a cabo el proceso de hidrólisis, tal como se describió en el desarrollo experimental. Tomando en cuenta que se buscaba producir una fase hidrolizada de OCP (OCPH), es decir un material con la presencia simultánea de las fases OCP y HAP en cantidad suficiente para su análisis, la determinación de los intervalos de tiempo necesarios para generar un cambio en el material inicial y finalmente conducir la reacción hasta obtener la transformación completa de OCP en HAP resultó ser de gran importancia.

En todos los casos se observó el comportamiento del pH en el proceso, para lo cual se registró el valor inicial y final de pH en el medio a temperatura ambiente. El valor promedio de pH al inicio fue de 7.2 y al final fue de 5.7. De acuerdo con lo propuesto en la literatura acerca del comportamiento del pH en función del tiempo, no se encontraron variaciones o efectos importantes a lo largo de los experimentos realizados.

Al igual que para el precipitado de OCP, la caracterización estructural de las fases involucradas en el proceso de hidrólisis se llevó a cabo en las muestras obtenidas a diferentes intervalos de tiempo por medio de DRX, MET convencional y MET de alta resolución.

Una vez realizada la hidrólisis, el material seco sigue presentando la apariencia de polvo, de color blanco, opaco, suave y formado por

aglomerados. En la figura 4.8 se presenta una vista general del material obtenido a diferentes tiempos de reacción.



Figura 4.8 *Hidrólisis de OCP. Después de secarlo, el resultado final a los diferentes tiempos de reacción es un polvo suave de color blanco.*

4.2.1 MEB

Para observar si se presentaron cambios en la morfología del material después de haber sido hidrolizado se utilizó el MEB. Se encontró que de forma general, aún después de la hidrólisis del polvo por 12 horas, los granos no presentaron cambios significativos y mantuvieron su forma acicular. En la figura 4.9 se presenta la imagen de MEB del polvo de OCP después de ser hidrolizado por 12 horas y se aprecia que el tamaño de los granos no es mayor a 1 μm .

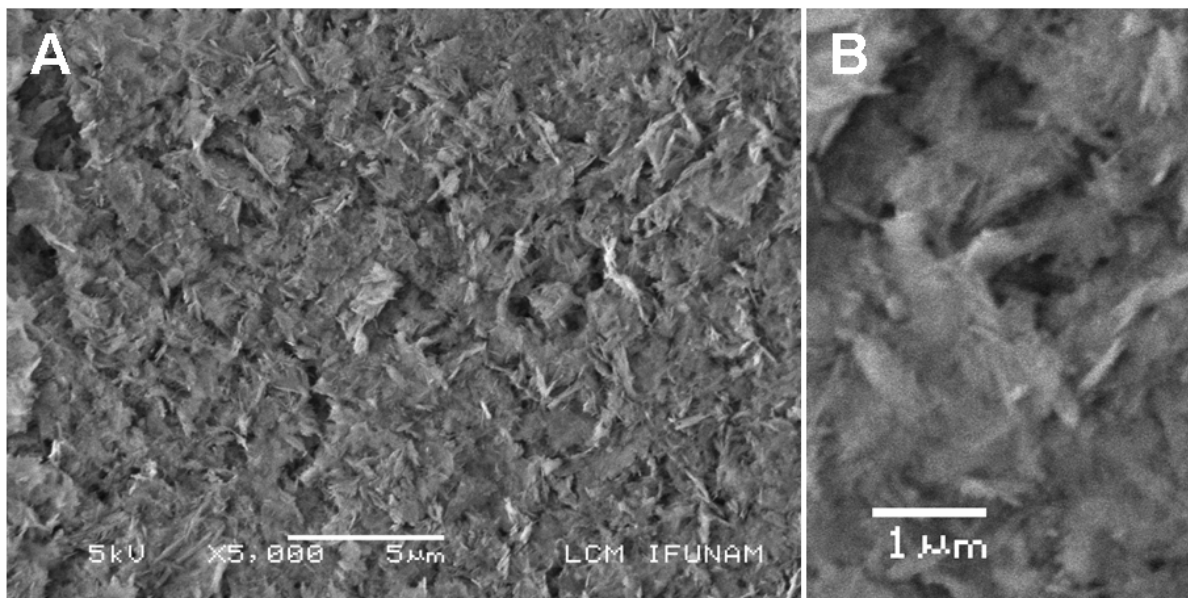


Figura 4.9 A) Imagen de MEB del polvo de OCP después de la hidrólisis. B) Amplificación. Note que los granos mantienen su forma acicular después del proceso.

4.2.2 DRX

El análisis por DRX del polvo obtenido en cada uno de los intervalos de tiempo permite comparar el efecto de la hidrólisis sobre la fase de OCP para determinar si se formó alguna otra fase durante el proceso y comprobar si la fase obtenida al final corresponde con HAP. La figura 4.10 muestra los difractogramas de rayos X del polvo antes y después de la reacción a diferentes tiempos de hidrólisis. Éstos se obtuvieron en el mismo equipo y bajo las mismas condiciones que para el precipitado de OCP. La primera línea (figura 4.10a) corresponde al OCP obtenido al inicio y sin hidrolizar, mientras que el resto (figura 4.10b-e) corresponde al material hidrolizado en los diferentes tiempos. El proceso avanza de tal forma que después de 30

minutos de reacción el difractograma muestra que los picos dominantes en rayos X corresponden a HAP. En la figura 4.10b se nota claramente la disminución del pico característico de OCP en el valor $2\theta=4.7$, a tal grado que apenas alcanza a percibirse. En la figura 4.10c se observa que después de 1 hora todos los picos difractados pueden asociarse con HAP. Finalmente en la figura 4.10d se encontró que después de 6 horas de reacción la fase presente corresponde a HAP. A partir de aquí no se perciben cambios significativos al aumentar el tiempo de reacción, como puede verse al comparar los difractogramas de 6 y 12 horas en la figura 4.10d y 4.10e respectivamente.

De acuerdo con estos resultados, eran las muestras con 30 minutos de reacción donde podrían encontrarse granos que presentaran ambas fases simultáneamente. Esto favorece la obtención del objetivo de trabajo, por lo que el resto de los análisis se enfocaron principalmente en este material.

4.2.3 REFINAMIENTO DE LA ESTRUCTURA POR EL MÉTODO DE RIETVELD

Los análisis de los difractogramas de rayos X indicaron que las fases HAP y OCP coexisten en las muestras con 30 minutos de reacción. Por lo tanto se realizó el refinamiento de las estructuras cristalinas presentes en esta muestra para determinar los parámetros de ambas estructuras, siguiendo la misma secuencia que en el caso de OCP, solo que ahora se agregaron los datos cristalográficos reportados en la literatura para HAP y se trabajó en un sistema de dos fases.

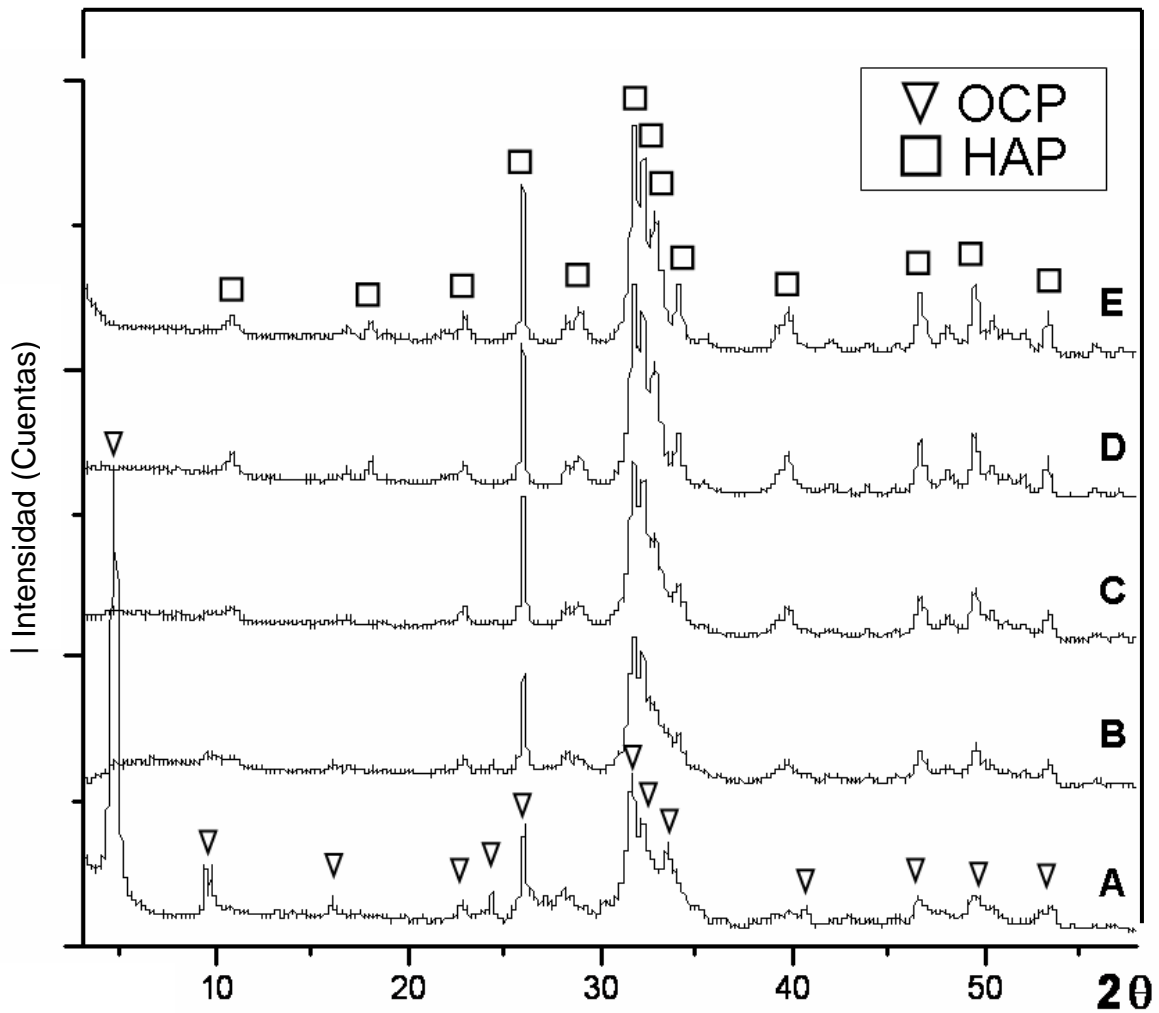


Figura 4.10 Difractogramas de rayos X del polvo de OCP hidrolizado a diferentes tiempos. (A) OCP sin hidrolizar, B) 30 min, C) 1 hora, D) 6 horas, E) 12 horas. Note la desaparición del pico característico de OCP en $2\theta=4.7$. Después de 12 h de hidrólisis el polvo corresponde a HAP.

En la figura 4.11 se muestra la gráfica de refinamiento de la estructura cristalina de las fases presentes en el material después de ser hidrolizado por 30 minutos. Las barras verticales indican las posiciones calculadas de los picos, las inferiores son de OCP y las superiores de HAP. La concentración

calculada fue de 14.6(2)% y 84.7(1)% en peso respectivamente. La tabla 4.2 contiene los valores calculados de parámetros de red y tamaño promedio de cristal para cada una de las fases.

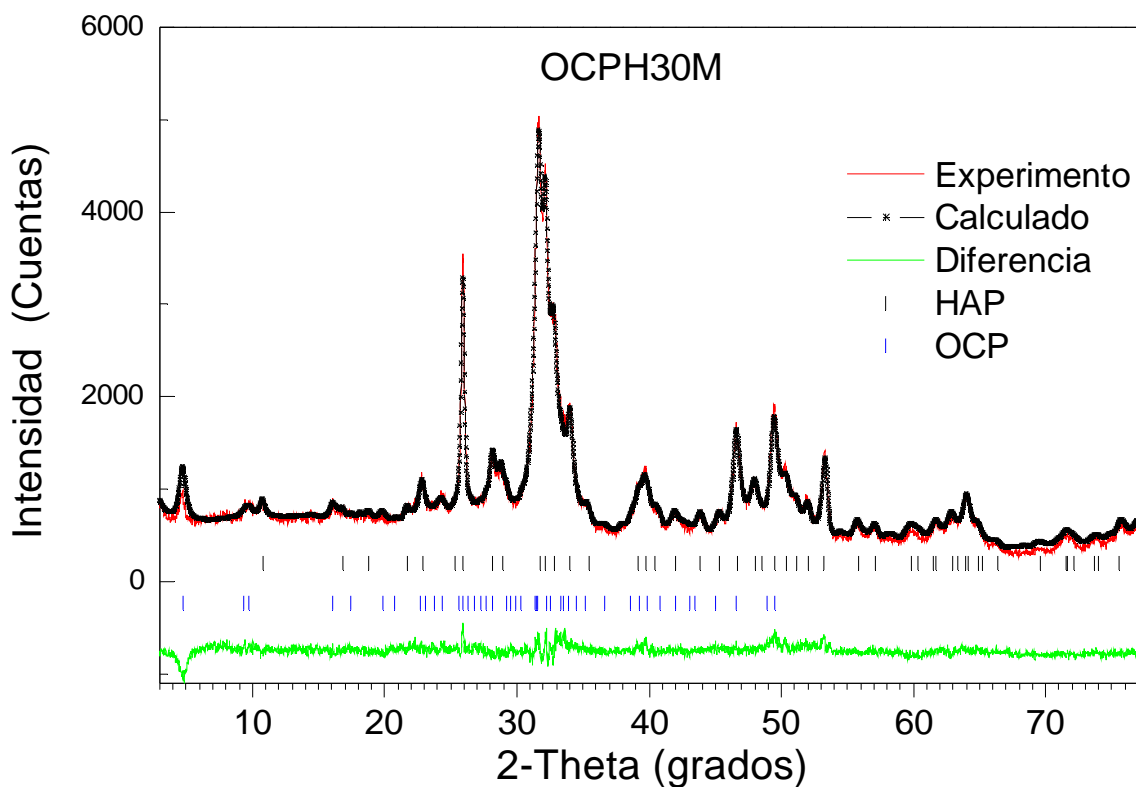


Figura 4.11 Espectro de refinamiento Rietveld para la muestra de OCP hidrolizado por 30 minutos.

Tabla 4.2

Parámetros calculados por refinamiento de la estructura cristalina de la muestra hidrolizada por 30 minutos.

Fase	OCP	HAP
<i>Parámetros de red</i>	$a=1.970, b=0.950,$ $c=0.685$ nm; $\alpha=90.03^\circ, \beta=92.48^\circ,$ $\gamma=108.32^\circ$	$a=0.945, c=0.687$ nm
Sistema	triclínico P-1	hexagonal P6 ₃ /m
Tamaño promedio del cristal	15.4 ± 0.2 nm	15.7 ± 0.6 nm.

4.2.4 MET

De la misma forma, se empleó la MET convencional y de alta resolución para analizar las características estructurales que presenta el polvo de OCP después de ser sometido al proceso de hidrólisis, principalmente en las muestras que reaccionaron por 30 minutos.

En la figura 4.12 se observan las imágenes de TEM en campo claro (4.12a) y campo oscuro (4.12c y 4.12d) de algunos granos que conforman el material hidrolizado por 30 minutos. Estos siguen presentando forma acicular con un tamaño menor a 0.5 μm . Las áreas brillantes dentro de los granos observados en las imágenes de campo oscuro indican la existencia de cristales de diferentes fases. Se observó que al utilizar otra reflexión del patrón de difracción de la figura 4.12b para obtener la imagen en campo oscuro, las áreas brillantes dentro de lo que parece ser el mismo grano también cambian, lo cual sugiere que las fases OCP y HAP coexisten en él.

Para poder afirmar en forma más concisa que dicho cambio en las áreas iluminadas se debía específicamente a la coexistencia OCP-HAP, fue necesario realizar otra serie de análisis de estos granos mediante la observación por TEM de alta resolución. Los patrones de difracción de electrones observados en TEM convencional en estas condiciones mostraron una combinación entre los que corresponden a OCP y los de HAP, ambos con diferentes proporciones y características debido a la forma y posición de las partículas.

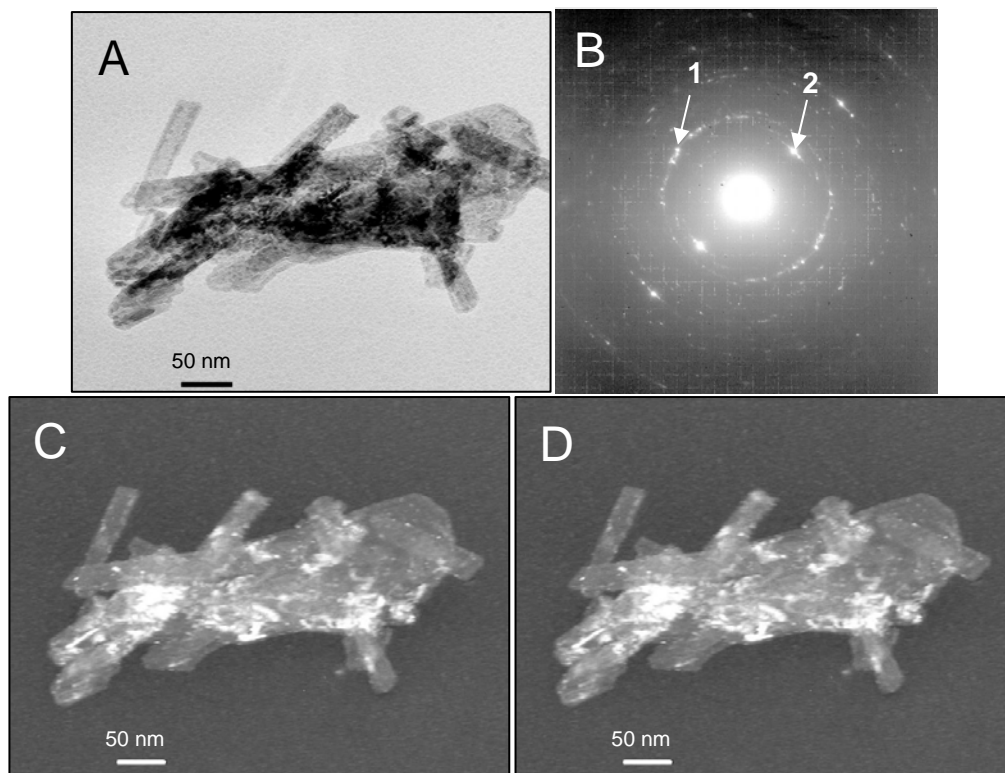


Figura 4.12 Imágenes de MET de uno de los granos del polvo. A) Campo claro. B) Patrón de difracción de área selecta. C) Campo oscuro formado al tomar la reflexión 1 indicada en B. D) Campo oscuro formado al tomar la reflexión 2.

La presencia de HAP en los granos de OCP después de ser hidrolizado es más clara cuando se observan por MET de alta resolución. Durante el análisis realizado a las diferentes muestras se encontró la existencia de granos con estructura de HAP, otros cuya estructura correspondía con la de OCP y otros más donde ambas fases se presentaban simultáneamente. Es claro que la presencia de cada uno de ellos está directamente relacionada al tiempo de hidrolizado, como pudo comprobarse en las muestras de 6 y 12 horas donde solo se encontraron granos con estructura de HAP.

En el caso donde el polvo fue sometido a 6 horas de hidrólisis, las imágenes de MET de alta resolución mostraron la periodicidad característica de la HAP en todos los granos que se analizaron y en ningún caso se encontró la presencia de OCP. La figura 4.13 muestra la imagen de uno de estos granos. La FFT ubicada en la parte superior izquierda de la figura 4.13a está indexada a lo largo del eje de zona $[1\bar{2}10]$. La sección enmarcada por el recuadro blanco fue procesada y el resultado se presenta en la figura 4.13b, donde puede apreciarse la periodicidad y la distancia característica de las reflexiones 0001 de HAP.

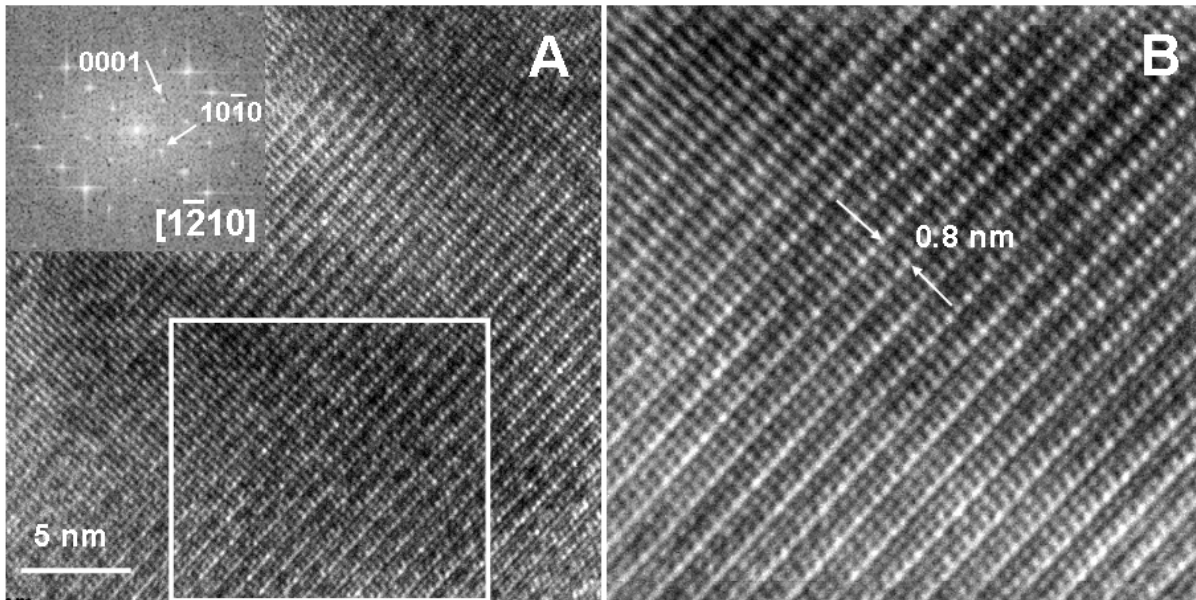


Figura 4.13 A) Imagen de MET de alta resolución de uno de los granos del polvo después de 6h de hidrólisis. El inserto en (A) muestra la FFT del área enmarcada que corresponde al eje de zona $[1\bar{2}10]$ de HAP.

En la muestra sometida a 30 minutos de reacción también se encontró la estructura de HAP. La figura 4.14 muestra las imágenes de MET de alta resolución de uno de los granos donde se localiza esta fase. La FFT en la parte superior derecha de la figura 4.14a indica que corresponde con el eje de zona $[1\bar{2}13]$ de HAP. La imagen procesada se presenta en 4.14b, así como el filtro empleado para obtenerla.

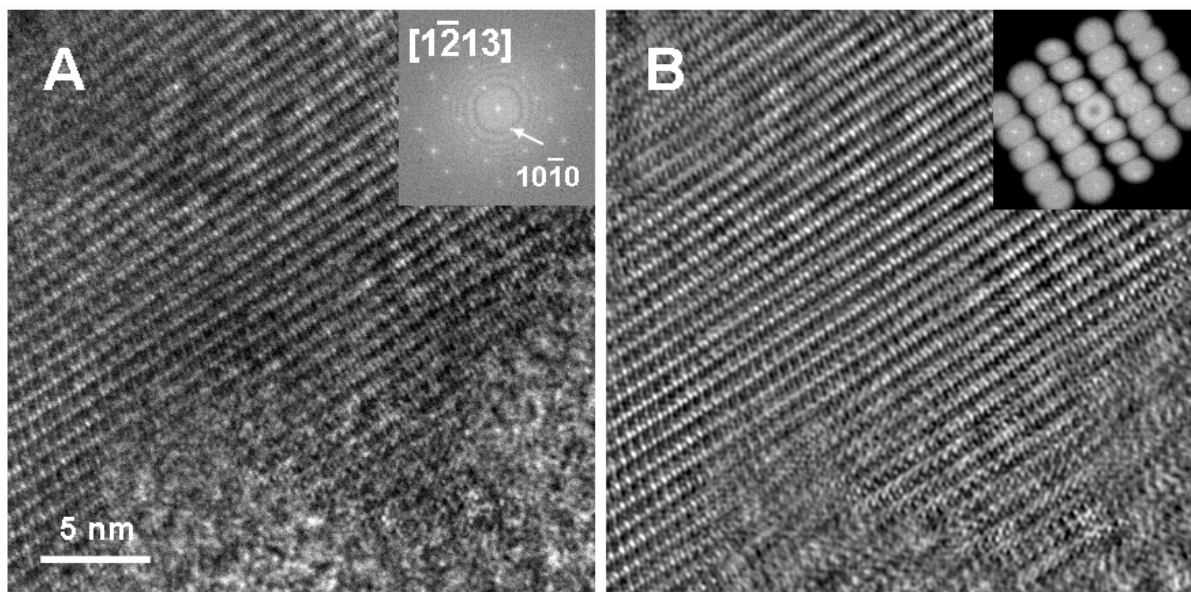


Figura 4.14 A) Imagen de MET de alta resolución del material después de 30 min de hidrólisis. El inserto en (A) muestra que la FFT de la imagen corresponde al eje de zona $[1\bar{2}13]$ de HAP. B) Imagen procesada de (A) y filtro utilizado.

4.2.5 SOBRE LA INTERFASE HAP-OCP

En la misma muestra de 30 minutos se encontraron granos donde era posible identificar la presencia de HAP y OCP en regiones adyacentes. La figura 4.15 muestra la imagen de TEM de alta resolución de uno de estos granos. En la figura 4.15b se observa la FFT del área indicada en el recuadro de la figura 4.15a. Al analizar, el arreglo de los puntos se observó que corresponde a OCP en la dirección $[010]$, pero que en la parte central se tiene un conjunto ordenado que no corresponde al eje de zona. Este nuevo conjunto puede obtenerse por separado al tomar solo la sección superior izquierda del recuadro, como se muestran en la figura 4.15c. Las reflexiones

se analizaron y concuerdan con la distancia y arreglo característicos de los planos $\{10\bar{1}0\}$ de HAP. Esto indica que ambas fases se encuentran en el área y que las reflexiones de la FFT corresponden al traslape del eje de zona $[010]$ de OCP con los puntos $\{10\bar{1}0\}$ de HAP. La figura 4.15d muestra la imagen de la zona después de ser procesada y en la esquina superior derecha el filtro que considera la superposición de las reflexiones. En ella se sugiere una claramente una interfase entre OCP y HAP, la cual se indica con una línea punteada, donde la parte inferior corresponde a OCP y la superior a HAP. Las distancias y los ángulos medidos para cada una de las fases también se detallan en la imagen.

Este tipo de muestras fueron las más útiles para analizar la orientación de cada fase porque OCP y HAP coexisten en la misma partícula. Por lo tanto puede afirmarse que el proceso de hidrólisis para la obtención de HAP a partir del polvo de OCP representa un buen camino hacia el estudio y caracterización de la interfase HAP-OCP y que una de sus principales ventajas es que permite obtener granos donde se presentan ambas fases, empleando tiempos cortos de aproximadamente 30 minutos.

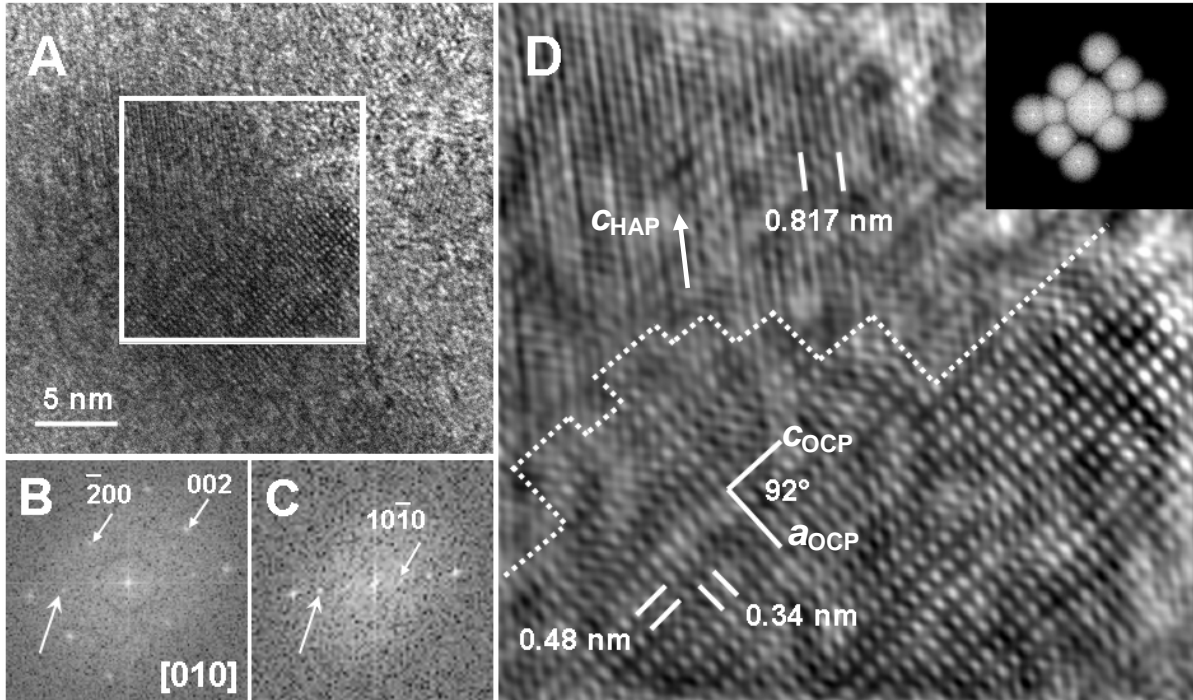


Figura 4.15 A) Imagen de MET de alta resolución de otro grano del polvo después de 30 minutos de hidrólisis donde se observa la coexistencia de ambas fases, HAP y OCP. B) La FFT del área en el recuadro indicado en (A) corresponde al traslape del eje de zona $[010]$ de OCP con los puntos $\{10\bar{1}0\}$ de HAP (mejor definidos en (C)). Las flechas más grandes indican el mismo punto $\{10\bar{1}0\}$ en ambos casos. D) Imagen procesada del área indicada en (A) usando el filtro mostrado en el inserto. Las líneas punteadas indican una frontera entre HAP y OCP. El ángulo formado entre c_{HAP} y c_{OCP} es de 56° y el ángulo entre c_{HAP} y a_{OCP} es de 143° .

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se obtuvo la fase OCP por precipitación y se realizó la transformación de OCP en HAP por hidrólisis, con lo cual fue posible estudiar y analizar por DRX y MET las fases OCP y HAP, tanto por separado como en los granos donde ambas coexistían.

Se determinó que el tiempo necesario para completar el proceso de hidrólisis y obtener un material formado solo por la fase HAP fue de seis horas. Este resultado difiere considerablemente de los resultados reportados por Graham y Brown [13], quienes indicaron que la transformación requiere más de 15 horas. La discrepancia entre estos valores podría deberse principalmente a la diferencia en forma y tamaño de los granos, que en este trabajo tienen forma de agujas y tamaño menor de 1 μm , mientras que los autores reportan granos aciculares de varias micras de tamaño. Puede afirmarse entonces, como ellos mismos sugieren, que la forma en la que se prepara el OCP afecta la extensión de la hidrólisis debido, entre otros aspectos, a que la difusión llega a ser el mecanismo limitante durante el proceso. Por lo tanto, es claro que para mejorar y tener una vía experimental que permita hacer investigación sobre la interfase OCP-HAP se debe tener un estricto control de las variables involucradas tanto en el método de obtención del OCP como en el método de hidrólisis.

En términos generales no se presentaron grandes dificultades experimentales para realizar el análisis estructural del polvo de OCP por DRX antes y después de la hidrólisis. En todos los casos un punto importante en la identificación de OCP radica en la observación del pico de difracción ubicado en el valor 2θ igual a 4.7. La existencia de este pico indica de forma fehaciente la presencia de ésta fase. Un ligero problema se encontró en la identificación del resto de los picos del difractograma, principalmente en las muestras sometidas a hidrólisis, ya que algunos de los picos son muy cercanos o incluso pueden coincidir con las reflexiones debidas a la presencia de HAP, de tal forma que su indexación se vuelve compleja y debe realizarse con cuidado.

A partir de los resultados de DRX en la muestra de OCP precipitado y en la muestra hidrolizada de OCP que contenía HAP se realizó el análisis de las fases por medio de refinamiento Rietveld y se obtuvo de manera detallada la cristalografía de las fases cristalinas a través de los parámetros de red. En el caso del refinamiento de la estructura cristalina del OCP, cuya gráfica se muestra en la figura 4.4, se ha reportado en la literatura una estructura cristalina triclinica con grupo espacial P-1, con parámetros de red $a=1.987$ nm, $b=0.963$ nm, $c=0.6875$ nm; $\alpha=89.3^\circ$, $\beta=92.2^\circ$, $\gamma=108.95^\circ$ (PDF 44-0778). Una vez refinada la estructura del OCP, los parámetros de red que se determinaron fueron $a=1.970$ nm, $b=0.950$ nm, $c=0.685$ nm; $\alpha=90.03^\circ$, $\beta=92.48^\circ$, $\gamma=108.32^\circ$. Es importante hacer notar que aún cuando estos valores son muy cercanos a los reportados en

la tarjeta PDF 79-0423 (tabla 4.1) se encontró que las intensidades de varios de los picos de difracción tienen diferencias significativas.

Así mismo en la muestra hidrolizada por 30 minutos donde se encontraban presentes ambos fosfatos (figura 4.11), se obtuvo la información detallada de cada estructura y además se aprovechó la capacidad de la técnica de Rietveld para calcular concentraciones. Se determinó que el porcentaje en peso es de 85% y 15%, para HAP y OCP respectivamente. Los resultados mostraron que el OCP mantiene los valores encontrados para la fase independiente ($a=1.970$ nm, $b=0.950$ nm, $c=0.685$ nm; $\alpha=90.03^\circ$, $\beta=92.48^\circ$, $\gamma=108.32^\circ$), mientras que en el caso de la HAP los valores para sus parámetros de red fueron $a=0.945$ nm, $c=0.687$ nm. Esta cristalografía puede dar pie a futuros estudios acerca del efecto de los parámetros experimentales relacionados con la preparación del material o con otros tratamientos.

Como se subrayó al inicio del trabajo, es muy importante conocer la relación estructural en la interfase de estos dos fosfatos de calcio dentro del campo de los biomateriales. En este sentido se ha descrito que existen similitudes entre los parámetros de red de la celda unitaria de OCP (triclínico P1, $a=1.969$ nm, $b=0.953$ nm, $c=6.85$ nm; $\alpha=90.13^\circ$, $\beta=92.13^\circ$, $\gamma=108.36^\circ$) y la celda unitaria de HAP (hexagonal $P6_3/m$, $a=0.9418$ nm, $c=0.6884$ nm), de tal forma que resulta inmediato el deseo de precisar la manera en que ambas celdas unitarias podrían unirse para formar una interfase. Esto ha dado origen a los tres modelos comentados previamente,

los cuales se presentan en forma esquemática en la figura 5.1. En la figura 5.1a puede apreciarse que en el caso de la propuesta de Brown [26], a_{HAP} es paralelo a b_{OCP} y se forma un ángulo de 167° entre a_{HAP} y a_{OCP} . En la figura 5.1b se observa la propuesta de Fernández et al. [42] donde $-a_{HAP}$ es paralelo a b_{OCP} y se forma un ángulo de 131° entre $-a_{HAP}$ y a_{OCP} . Por último en la figura 5.1c la propuesta de Xin [43], donde a_{HAP} es paralelo a a_{OCP} y se forma un ángulo de 168° entre a_{HAP} y b_{OCP} y un ángulo de 64° entre a_{HAP} y a_{OCP} . En todos los casos c_{OCP} es paralelo a c_{HAP} .

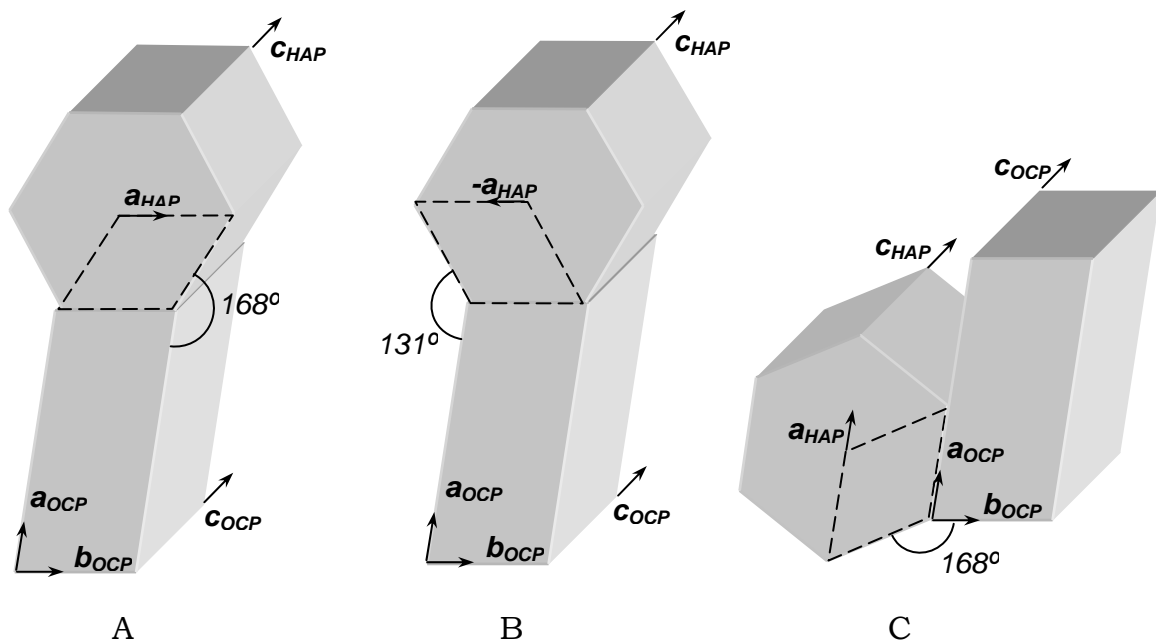


Figura 5.1 Relación de orientación entre las celdas unitarias de OCP (triclínica) y HAP (hexagonal) de acuerdo con lo propuesto por A) Brown [26], B) Fernández [42] y C) Xin [43].

De acuerdo con estos arreglos, cabe resaltar que un punto importante para el análisis de muestras por microscopía electrónica es el

hecho de que el desajuste en la interfase OCP-HAP será suficiente para dar origen a defectos estructurales tales como las dislocaciones, ya que la diferencia entre $a_{\text{HAP}}=0.942$ nm y $b_{\text{OCP}}=0.953$ nm provoca un desajuste de 1.2% en la red, en los casos de Brown [26] y de Fernández et al. [42], mientras que la diferencia entre $a_{\text{HAP}}=0.942$ nm y $\frac{1}{2}a_{\text{OCP}}=0.985$ nm es de 4.5% en el caso de Xin et al. [43]. Hasta ahora no se ha reportado evidencia experimental acerca de la presencia de estos defectos en la interfase y es clara la necesidad que existe de la obtención de datos experimentales que validen una de esas relaciones.

En la figura 4.15 se observa una interfase entre $[010]$ de OCP y un conjunto de puntos de $\{10\bar{1}0\}$ de HAP. El conjunto de puntos $\{10\bar{1}0\}$ en HAP pertenece a los patrones de difracción a lo largo del eje de zona $[\bar{1}2\bar{1}0]$. En la figura 5.2 se muestra el arreglo que presentaría tanto el modelo sugerido por Brown como el modelo sugerido por Fernández cuando se observan a lo largo de la dirección indicada por la figura 4.15, es decir a lo largo del eje de zona $[010]_{\text{OCP}}$. Se puede ver que la interfase que se genera es tal que c_{OCP} es paralelo a c_{HAP} . De esta manera, cuando el OCP presenta el eje de zona $[010]$, la HAP debe mostrar el eje de zona $[\bar{1}2\bar{1}0]$. En el caso del modelo sugerido por Xin, la figura 5.3 indica que cuando este se observa a lo largo de la dirección $[010]_{\text{OCP}}$, la interfase no será observable debido a la superposición de las fases OCP y HAP. También la figura 5.3 indica que para poder observar la interfase, el haz debe de viajar en la

dirección $[100]_{OCP}$, en cuyo caso la HAP se observará a lo largo del eje de zona $[\bar{1}2\bar{1}0]$.

Además de acuerdo con ambas figuras, si se observa la interfase de tal manera que la HAP se presente a lo largo del eje de zona $[0001]$ el OCP deberá presentar el eje de zona $[001]$, con la diferencia de que en el modelo de Brown y en el modelo de Fernández, b_{OCP} y a_{HAP} son paralelos, mientras que en el modelo de Xin, a_{OCP} y a_{HAP} son paralelos.

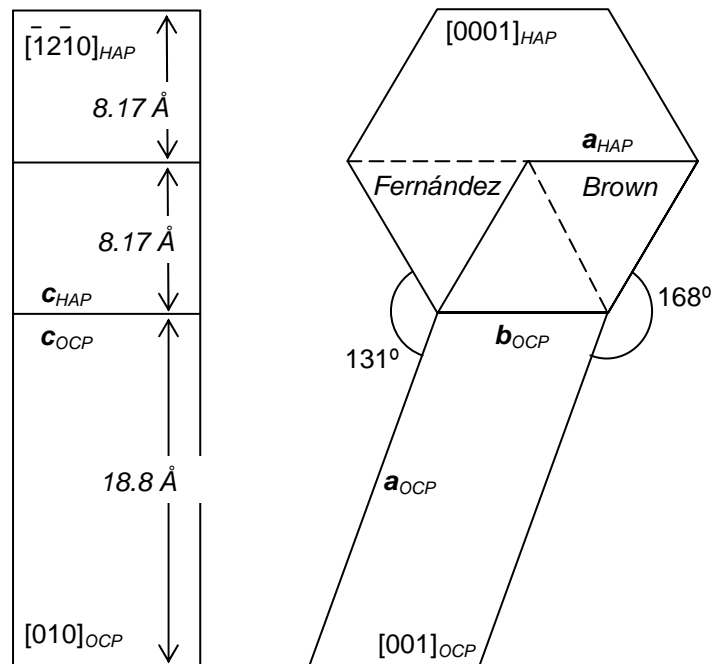


Figura 5.2 Relación de orientación entre las celdas unitarias de OCP (triclínica) y HAP (hexagonal) de acuerdo con el modelo propuesto por Brown [26] y Fernández [42].

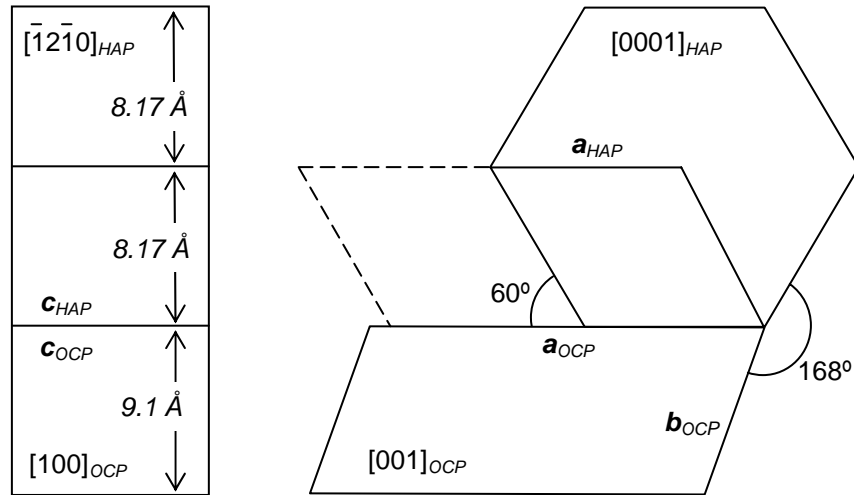


Figura 5.3 Relación de orientación entre las celdas unitarias de OCP (triclínica) y HAP (hexagonal) de acuerdo con lo propuesto por Xin [43].

Volviendo a la figura 4.15, en ella se observa que el ángulo formado entre c_{OCP} y c_{HAP} es de 56° y el ángulo entre a_{OCP} y c_{HAP} es de 143° . Este resultado no se relaciona directamente con alguno de los tres modelos comentados. Esta misma situación se obtiene incluso cuando se analiza la figura 7 de la referencia [28], pues ninguna de las relaciones mostradas por la interfase de esa figura puede ser reproducida con los modelos propuestos.

Es claro por lo tanto, que los resultados presentados en este trabajo de tesis concluyen que el tema de la interfase HAP-OCP sigue siendo un tema abierto a investigación. Por supuesto, esto también implica que se requieren más y mejores observaciones experimentales para dilucidar la relación estructural real de la interfase OCP-HAP.

Es importante comentar que existen condiciones experimentales que deben tomarse muy en cuenta para la óptima observación del material obtenido en este trabajo. Al hacer el estudio de estos materiales por microscopía electrónica de transmisión, principalmente en el caso de alta resolución, el haz electrónico produce cambios estructurales en muy corto tiempo. Estos cambios, la mayoría de las veces tendientes a la amorfización de la muestra, no permiten tener tiempo suficiente para la realización del estudio estructural de las fases HAP y OCP, así como de la fase que conforman. De hecho, Xin et al [43] han reportado el fenómeno, de acuerdo a sus observaciones, de la transformación de la fase OCP en HAP inducida sólo por el efecto de la interacción del haz electrónico sobre los granos de OCP, al exponerlos durante su observación. El hecho de presentarse este proceso en la muestra tiene un efecto importante al analizar la estructura del OCP en el MET de alta resolución, pues desde el punto de vista experimental implica que existe un tiempo límite para llevar a cabo este análisis, el cual puede ser de escasamente unos cuantos segundos. Una posibilidad para tratar con este proceso implica la necesidad de utilizar algún equipo de video que permita registrar los acontecimientos que se suceden durante la interacción del haz electrónico con la muestra de OCP y HAP y de esa manera estar en posición de hacer un estudio detallado de este proceso. Es también recomendable el empleo de algún otro método experimental para ampliar el tiempo de estudio de la interfase OCP-HAP y de las respectivas fases que la conforman.

Finalmente, no cabe duda que aplicar el método de hidrólisis en los materiales formados por fosfatos de calcio, en particular OCP y HAP, representa un camino con una amplia gama de posibilidades para el estudio de las fases ya que además de lo descrito hasta ahora, el método permite obtener materiales donde podrían analizarse otros fenómenos como las transiciones que se producen en la muestra y los sucesos dinámicos involucrados.

6. CONCLUSIONES

- ✓ Se produjo satisfactoriamente OCP por precipitación y HAP por hidrólisis directa de OCP.
- ✓ La transformación completa de OCP en HAP se registró cerca de las 6 horas de hidrólisis.
- ✓ Las fases OCP y HAP son estados puros al inicio y al final de la hidrólisis, respectivamente.
- ✓ La muestra con 30 minutos de hidrólisis mostró la coexistencia de ambas fases. Este sistema intermedio permite estudiar el comportamiento estructural de OCP y HAP por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución.
- ✓ En la muestra con 30 minutos de hidrólisis, los parámetros calculados por el método Rietveld para OCP fueron $a=19.70$, $b=9.50$, $c=6.85$ Å; $\alpha=90.03^\circ$, $\beta=92.48^\circ$, $\gamma=108.32^\circ$, que concuerdan con un sistema triclinico P-1. El tamaño promedio calculado del cristal de OCP fue de 15.4 ± 0.2 nm.
- ✓ En la muestra con 30 minutos de hidrólisis, los parámetros calculados por el método Rietveld para HAP fueron $a=9.45$, $c=6.87$ Å que concuerdan con el sistema hexagonal $P6_3/m$. El tamaño promedio calculado del cristal de HAP fue de 15.7 ± 0.6 nm.
- ✓ Las relaciones encontradas experimentalmente para la interfase HAP-OCP no pueden ser reproducidas en su totalidad con alguno de los tres modelos propuestos hasta ahora.



Synthesis and hydrolysis of octacalcium phosphate and its characterization by electron microscopy and X-ray diffraction

M.J. Arellano-Jiménez, R. García-García, J. Reyes-Gasga*

Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 20-364, Mexico 1000 D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2008

Received in revised form

15 August 2008

Accepted 3 November 2008

Keywords:

B. Chemical synthesis

C. Electron microscopy

C. X-rays diffraction

D. Crystal structure

D. Phase transitions

ABSTRACT

Octacalcium phosphate (OCP) powder was produced by precipitating 250 mL $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 0.04 M into 750 L of phosphate solution (5 mmol Na_2HPO_4 and 5 mmol NaH_2PO_4) at a constant temperature of 60 °C and pH 5, which resulted in a dry white powder. X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM) analysis, and the electron diffraction pattern (SAED) all showed only OCP. Hydroxyapatite (HAP) was directly obtained through hydrolysis of the powder. The total transformation of OCP into HAP was registered over a period of 6 h. During the first 30 min of hydrolysis both phases coexisted. The two phases and the OCP–HAP interface were structurally analyzed through XRD and TEM. OCP parameters (calculated by the Rietveld method) are $a = 19.70$, $b = 9.50$, $c = 6.85$ Å; $\alpha = 90.03^\circ$, $\beta = 92.48^\circ$, $\gamma = 108.32^\circ$ (triclinic P-1) with average crystal size of 13.5 ± 0.2 nm, while HAP parameters were $a = 9.45$, $c = 6.87$ Å (hexagonal $\text{P6}_3/\text{m}$) with average crystal size of 16.9 ± 0.2 nm.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Synthesis methods for the production of octacalcium phosphate (OCP, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) and hydroxyapatite (HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$) are of great scientific interest in the field of biomaterials due to their importance in the formation of mineralized tissue [1,2]. Specifically, HAP is the main constituent of bone, tooth enamel, and dental calculi, while OCP plays an important role in its formation. Thus, new processing operations of OCP and HAP are a paramount, for they open new possibilities to study their properties and common interactions of these both phases.

The crystallization of many soluble salts involves the formation of metastable precursor phases that subsequently dissolve as the precipitation reactions proceed [3–6]. The methods to prepare OCP and HAP have been summarized by LeGeros [6]. In the case of OCP, the process is complicated because of the large number of phases that participate in these reactions (e.g., dicalcium phosphate and tricalcium phosphate) [1]. It has been shown that the stability of OCP decreases with temperature and pH [2,4,5]. Therefore, most of the calcium phosphate synthesis methods are carried out under precisely controlled conditions. In this work OCP was prepared by powder precipitation and HAP was subsequently processed by hydrolysis of this powder.

The interest in kinetics of transformation between the OCP and HAP phases, particularly the role of OCP in the nucleation and

growth of HAP, has increased in recent years due to its importance in mineralization and demineralization of tissues. Moreover, recent thermodynamic analyses have shown that OCP is a metastable phase of HAP [2,7], and, therefore, OCP is transformed into HAP in order to reach a stable equilibrium [1,8,9]. OCP can produce HAP through two possible processes [9]: the first one by hydrolysis of OCP and, the second one, by dissolution of OCP after precipitation [10,11]. It is hypothesized that OCP precipitates first and then hydrolyzes irreversibly to a transient product intermediate between OCP and HAP. A hydrolyzed OCP (OCPH) contains OCP and HAP domains. Furthermore, Xin et al. [12] have reported the transformation of OCP into HAP by electron beam radiation in situ observations in the transmission electron microscope (TEM) also observing OCP and HAP domains as a result of a solid-state-transformation mechanism in the OCP crystals.

Similarly, hydrolysis processing delivers an irreversible solid-state reaction whose product is heterogeneous and highly imperfect. Graham and Brown [13] reported the relationships between the rates of hydrolysis, micro-structural evolution, and variations in solution chemistry during the transformations of OCP into HAP. Their results show that the final spatial configuration of the phases depends on the initial chemistry of the solution while the OCP reactivity depends on the selected processing operation.

Experimental results also indicate that HAP and OCP produce an epitaxial interface [14]. The coexistence of both the OCP and HAP phases enables the possibility of studying their interface and associated interactions. The present work presents structural characteristics of the OCP powder and of the resultant HAP from

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 5083; fax: +52 55 5622 5008.
E-mail address: jreyes@fisica.unam.mx (J. Reyes-Gasga).

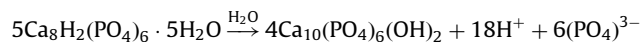
the hydrolysis of the precursor OCP powder. The characterization of both phases was carried out by electron microscopy and X-ray diffraction (XRD).

It is worth to say that there is a possibility of misidentification between OCP and HAP structures when using the XRD because of their similarity. The main difference between the XRD spectra of the two phases is the characteristic peak of OCP at $2\theta = 4.7$. We carefully identify the OCP and HAP structures through XRD and selected area electron diffraction patterns (SAEDP) of single crystals obtained by transmission electron microscopy (TEM), which provides reliable way to identify OCP and HAP phases in a conspicuous manner [2].

2. Experimental procedure

OCP was synthesized by precipitation by dropping 250 mL of 0.04 M $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ into 750 L of phosphate solution (5 mmol Na_2HPO_4 and 5 mmol NaH_2PO_4). The sample was continuously stirred at a constant temperature of 60 °C and pH 5. The precipitated material was washed with distilled water and dried at 37 °C. Fig. 1 shows the white powder that resulted from the precipitation process.

Graham and Brown [13] have hydrolyzed OCP to obtain OCPH following two processing sequences: (1) by directly mixing OCP with tetracalcium phosphate and calcium hydroxide in stoichiometric amounts; and (2) through direct hydrolysis. Significant differences in the total transformation time from OCP to HAP, and traces of the used precursors were found through the first approach. Direct hydrolysis provides the cleanest and less time consuming process to obtain HAP by starting from OCP. Then, in this work the OCP to HAP transformation was induced through direct hydrolysis, according to the reaction:



One hundred milligrams of the OCP obtained above and 100 mL of distilled water were placed into a two-necked flask, equipped with a condenser and a thermometer. The starting pH was 7.2 and refluxed at 60 °C for 30 min. The final pH was 5.7, similar to that reported in Fig. 6f of Ref. [13]. The outlined process was repeated for three different samples for 1, 6, and 12 h. The product was filtered, washed with distilled water, and dried in a furnace at 37 °C. White powder samples were obtained.

The produced samples were analyzed by XRD, scanning (SEM), and transmission (TEM) electron microscopes. The XRD analyses were carried out using XRD diffractometer Bruker model D8—advanced using monochromatic $\text{Cu}_{(\text{K}\alpha)}$ radiation ($\lambda = 0.154$ nm), a nickel absorber secondary-beam, and a Linxeye area

detector. The diffraction patterns were scanned between 3° and 110° with a step size of 0.02° (2θ) and 162 s counting time per step using the Bragg–Brentano geometry. Crystalline structures were refined via Rietveld method using the FullProf code [15]. The use of a pseudo-Voigt function [16] for modeling the peak profiles provides the average crystallite size as one of its characteristic parameters [17]. The starting atomic positions for OCP with space group P-1 were taken from Brown [18] and from Kay et al. [19] for HAP with space group $\text{P6}_3/\text{m}$.

For the SEM analysis, samples were glued into the SEM holder with carbon paint and any additional conductive film cover was required. For TEM observation and analysis, samples were milled in an agate mortar and filtered through a 325 mesh grid. Then, it was supported on Cu grids that were covered previously with lacey plastic and carbon films. These Cu grids were further recovered with a 10 nm thick carbon film to minimize both electron beam damage and electrical charge effects produced during TEM observation.

A JEOL-100CX microscope was used for TEM observations and JEOL FEG2010 for high resolution TEM (HRTEM). A low-vacuum scanning electron microscope (LV-SEM) Jeol 5600LV was used for SEM observations. Digital Micrograph (DM) software from GATAN was used for digital image processing. Fast Fourier Transforms (FFT) and statistical measurements. Computer simulations of the OCP and HAP unit cells and their electron diffractions patterns were performed using the EMS program.

3. Results

The obtained powder was conformed mostly of flake-like and acicular grains of one micrometer in size (see Fig. 1). XRD identified it as OCP (PDF #44-0778 [20]). TEM diffraction patterns (Fig. 2) and HRTEM images (Fig. 3) also indicated that the structure of the powder corresponds to OCP. No other phase was observed (Fig. 4).

It is worth to say that OCP has several PDF tables, and in some of them (e.g., PDF #26-1056) the crystallography data is interchanged. In this paper, the data from PDF #44-0778 was followed, which is in concordance to Brown [18]. Other researchers reported data similar to PDF #79-0423 [21]. Unit-cell models for HAP and OCP were built according to the data determined by Kay et al. [19] and Brown [18], respectively. Fig. 5 shows the simulated SAED for OCP along the [100], [010], [001] and [110] zone axes. Fig. 6 shows the corresponding for HAP along [0001], [1 $\bar{2}$ 10] and [10 $\bar{2}$ 0] zone axes.

After hydrolysis of the powder shown in Fig. 1, grains still show the acicular shape (Fig. 7). Fig. 8 shows the corresponding X-ray diffractograms before (Fig. 8a) and after hydrolysis (Figs. 8b–e).

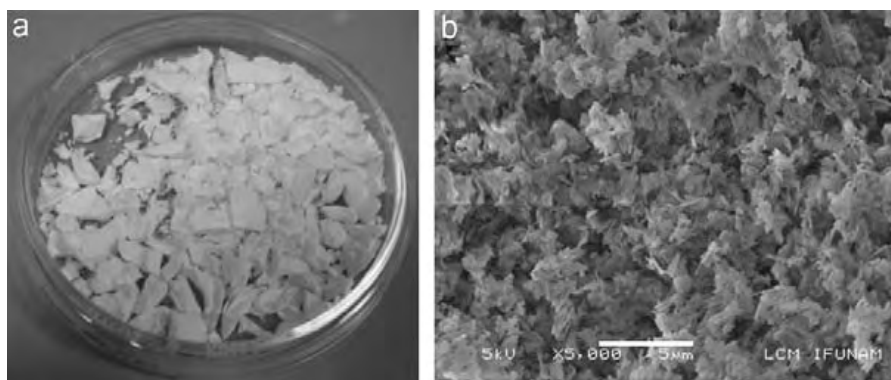


Fig. 1. (a) OCP powder obtained by the precipitation process described in the text. (b) SEM image of the powder shown in (a); it is formed by the acicular grains of 1 μm in size.

Fig. 8b denotes the disappearance of the characteristic OCP peak at $2\theta = 4.7$. Moreover, after 30 min of reaction time the diffractogram demonstrates that the HAP peaks are dominant. After 1 h, almost all the diffracted peaks correspond to HAP.

The 30 min reacted sample show grains where the two phases coexist. HRTEM shows the existence of HAP in the OCP grains. Fig. 9 shows the HRTEM image of the HAP structure in one of the grains. FFT indicates that it corresponds to the $[1\bar{2}13]$ zone axis of HAP. Fig. 10 shows the HRTEM image of a grain where the HAP and OCP are observed to coexist. The FFT from the squared area in Fig. 10a indicates the coexistence of OCP and HAP: it corresponds to the overlapping of the $[010]$ zone axes of OCP and the spots $\{10\bar{1}0\}$ of HAP. Fig. 10d shows the processed image from the squared area, and conspicuously indicates an interface between OCP and HAP phases, where the lower part of this figure correspond to OCP and the upper part to HAP.

When the 6 h hydrolyzed powder is observed through HRTEM, the common HRTEM contrast already reported elsewhere [22] for HAP is obtained. Fig. 11 shows the HRTEM image of one of the grains of the powder after 6 h of hydrolysis along the $[2\bar{1}\bar{1}0]$ zone axis. The parameters calculated by the Rietveld method from the XRD spectrum shown in Fig. 8a for OCP were $a = 19.70$, $b = 9.50$, $c = 6.85$ Å; $\alpha = 90.03^\circ$, $\beta = 92.48^\circ$, $\gamma = 108.32^\circ$ (triclinic P-1) with an average crystal size of 13.5 ± 0.2 nm; while for HAP (calculated from Fig. 8e) were $a = 9.45$, $c = 6.87$ Å (hexagonal $P6_3/m$) with average crystal size of 16.9 ± 0.2 nm.

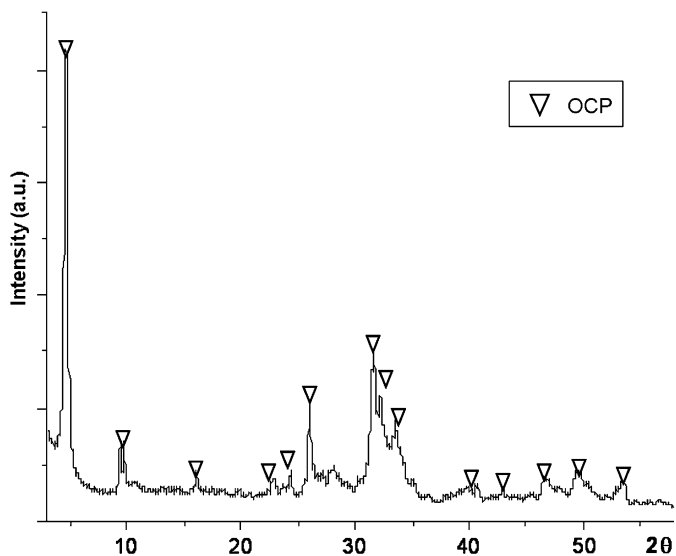


Fig. 2. X-ray diffractogram of the OCP powder shown in Fig. 1a. Indexing indicates that it corresponds to OCP (PDF #44-0778).

4. Discussion

In this work we have shown the transformation of OCP into HAP by hydrolysis following the process reported by Graham and Brown [13] and we were able to analysis the OCP and HAP phases, separated or forming an interface, by TEM and XRD. Moreover we found that the total transformation of OCP into HAP was done in 6 h, while Graham and Brown [13] reported 15 h.

The difference in time could be a result of grain size and morphology, which in our case it is flake-like and smaller (1 μm), while their reported value has acicular grains and a grain size of several microns. Moreover, as in agreement with Graham and Brown [13], the preparation procedure directly impacts the extent of the hydrolysis because diffusion is the rate limiting mechanism. The present analysis shows that improved control of the processing variables is necessary to understand the OCP–HAP interface.

The structural similarities between the unit cells of HAP (hexagonal $P6_3/m$, $a = 9.418$, $c = 6.884$ Å) and OCP (triclinic P1, $a = 19.69$, $b = 9.53$, $c = 6.85$ Å; $\alpha = 90.13^\circ$, $\beta = 92.13^\circ$, $\gamma = 108.36^\circ$), allow to suggest the way that HAP and OCP come together to built an interface. Three approaches are reported in the literature. The first one was proposed by Brown [18], where a_{HAP} is glued with b_{OCP} forming an angle of 167° between a_{HAP} and a_{OCP} .

The second one was proposed by Fernández et al. [23] where a_{HAP} is glued with b_{OCP} forming an angle of 131° between a_{HAP} and a_{OCP} . And the third has been recently proposed by Xin [12] where a_{HAP} is glued with a_{OCP} forming an angle of 128° between a_{HAP} and b_{OCP} . In all these cases, c_{OCP} is parallel to c_{HAP} . From here, the availability of experimental data enable to validate the correct relationships.

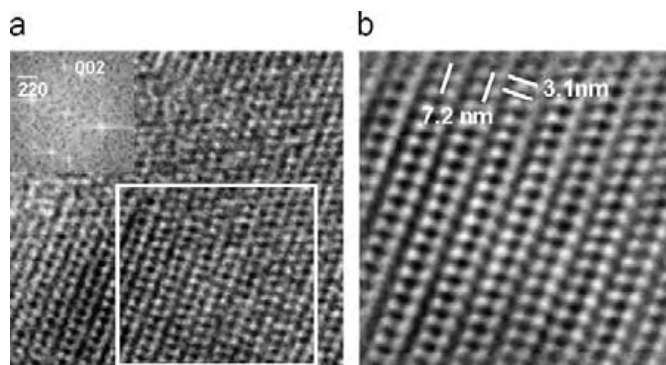


Fig. 4. (a) HRTEM image of one of the grains of the powder shown in Fig. 1a. (b) Processed image of the area is indicated by the square in (a). The inset shows the FFT of the squared area; it corresponds to the $[-110]$ zone axis of OCP.

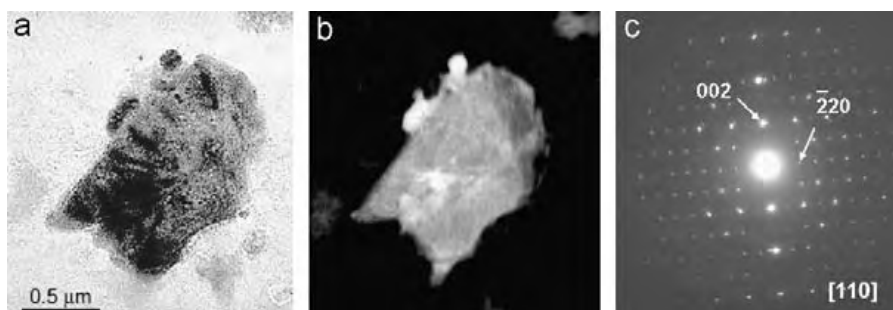


Fig. 3. TEM images of one of the grains of the powder shown in Fig. 1a: (a) bright field, (b) dark field and (c) selected area electron diffraction pattern along the $[110]$ zone axis of the OCP unit cell.

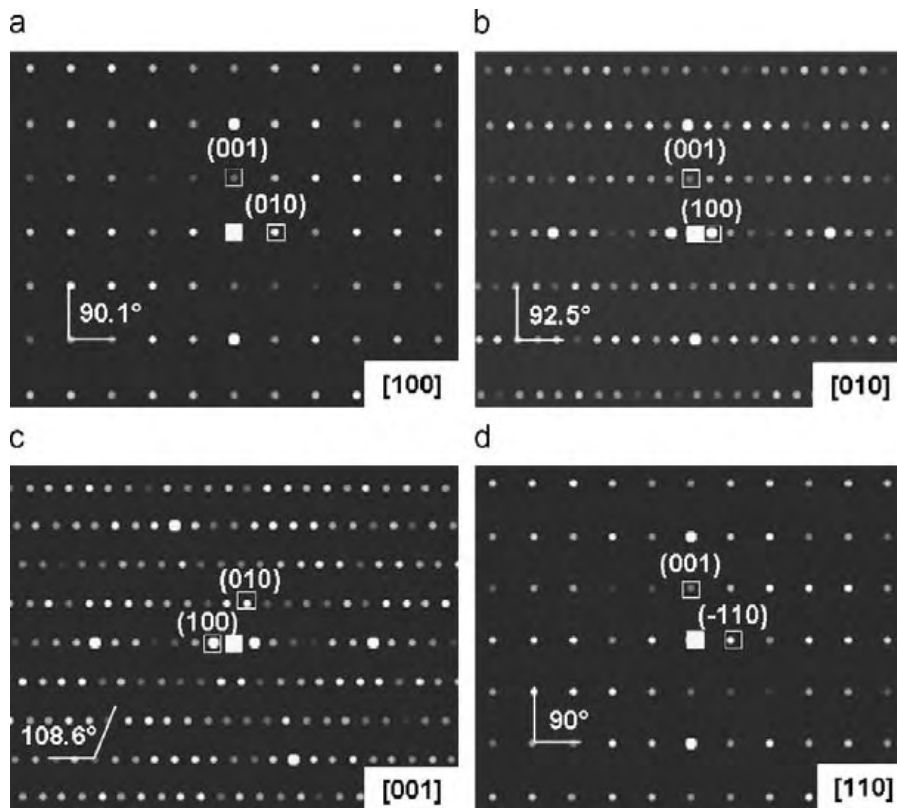


Fig. 5. Simulated diffraction patterns for OCP: (a) [100], (b) [010], (c) [001] and (d) [110].

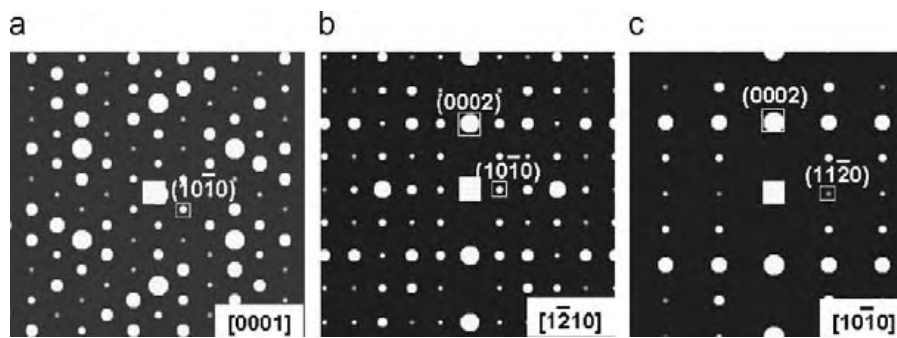


Fig. 6. Simulated diffraction patterns for HAP: (a) [0001], (b) [1210] and (c) [1010].

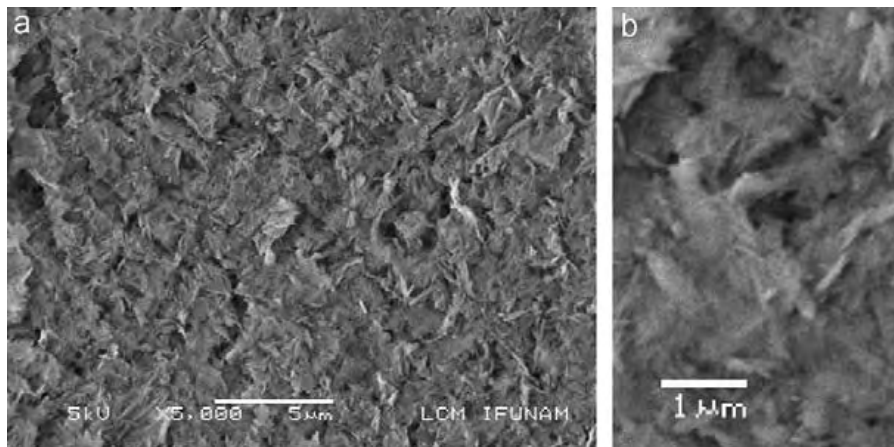


Fig. 7. (a) SEM image of OCP powder after hydrolysis. (b) Magnified view. Note the grains are still acicular after the process.

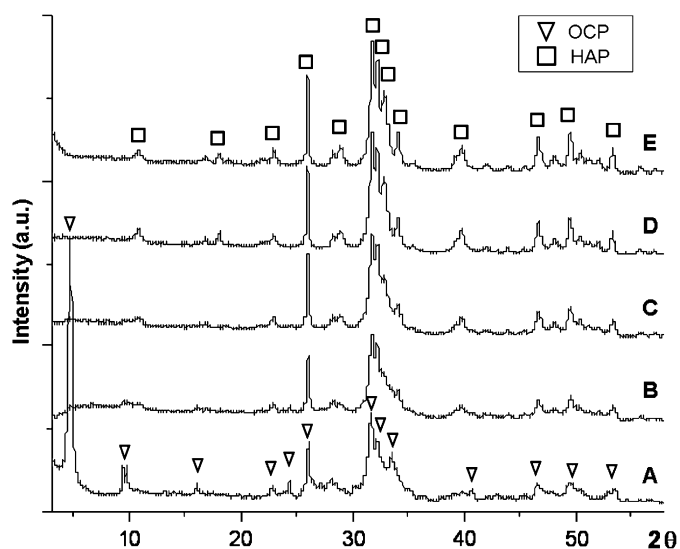


Fig. 8. X-ray diffractograms of the OCP powder before (a) and after (b–e) hydrolysis at different times. (b) 30 min, (c) 1 h, (d) 6 h, (e) 12 h. Note the disappearance of the characteristic peak of OCP at $2\theta = 4.7$. The hydrolyzed powder after 12 h corresponds to HAP.

The OCP–HAP relationship reported by Fernández et al. [23] is supported by the use of a minimum free-energy optimization argument. Moreover, a_{HAP} is only 0.942 nm and b_{OCP} is 0.953 nm, then there will be a misfit of 1.2% in the case of Fernández et al. [23], while Xin et al. [12], reports that a_{OCP} is 0.985 nm, producing a misfit of 4.5%. This difference is enough to give rise to several types of interfacial defects, such as dislocations. However, no experimental evidence has been provided to justify the existence of defects in this interface.

Fig. 10 shows an interface between $[010]$ of OCP and a set of $\{10\bar{1}0\}$ planes of HAP. The set of $\{10\bar{1}0\}$ spots of HAP in the FFT shown in Fig. 10c corresponds to the diffraction pattern along $[1\bar{2}10]$ zone axis but the electron beam has been slightly out of the exact zone axis. This orientation is in agreement with the relationship reported by Fernández et al. [23], where b_{OCP} is parallel to c_{HAP} . Of course, more experimental observations are required in order to elucidate the real relationship of the HAP–OCP interface. We are working now in this direction.

5. Conclusions

We have successfully produced OCP by precipitation and HAP by direct hydrolysis of OCP. The parameters calculated for OCP

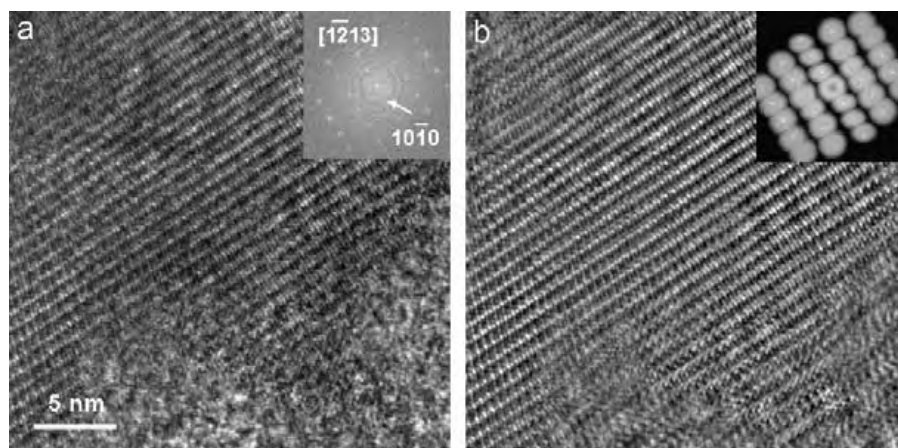


Fig. 9. (a) HRTEM image of one of the grains of the powder after 30 min of hydrolysis. Inset in (a) shows FFT of the image and indicates that it corresponds to $[1\bar{2}13]$ zone axis of HAP. (b) Processed image of (a). Inset in (b) shows the filter used to obtain the image.

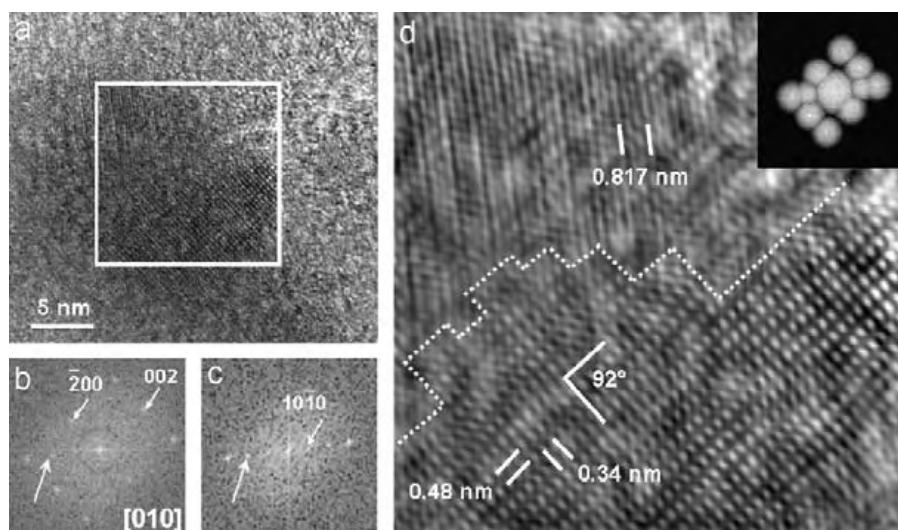


Fig. 10. (a) HRTEM image of another grain of the powder after 30 min of hydrolysis where coexistence of HAP and OCP is observed. (b) FFT from the squared area indicated in (A); it correspond to the overlapping of the $[010]$ zone axis of OCP and the $\{10\bar{1}0\}$ spots of HAP (better observed in (c)). The biggest arrow indicates the same $\{10\bar{1}0\}$ spot in both cases. (d) Processed image of the squared area indicated in (A) using the filter indicated in the inset. Dashed lines indicate a boundary between HAP and OCP.

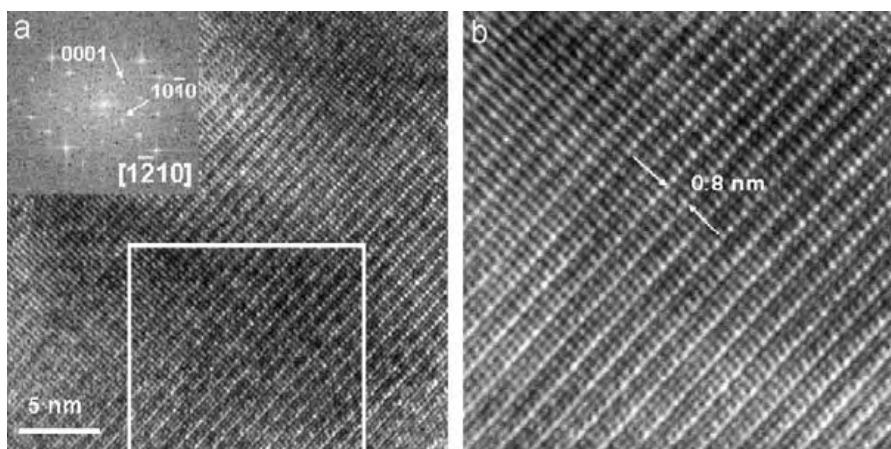


Fig. 11. (a) HRTEM image of one of the grains of the powder after 6 h of hydrolysis. Inset in (a) shows the FFT of the squared area; it corresponds to the $[1\bar{2}10]$ zone axis of HAP. (b) Processed image from the squared area indicated in (a).

were $a = 19.70$, $b = 9.50$, $c = 6.85 \text{ \AA}$; $\alpha = 90.03^\circ$, $\beta = 92.48^\circ$, $\gamma = 108.32^\circ$ (triclinic P-1) with average crystal size of $13.5 \pm 0.2 \text{ nm}$, while for HAP the parameters were $a = 9.45$, $c = 6.87 \text{ \AA}$ (hexagonal $P6_3/m$) with average crystal size of $16.9 \pm 0.2 \text{ nm}$. The complete transformation of OCP into HAP was registered in nearly 6 h. The 30 min processed sample shows the coexistence of both phases. The reported intermediate system allows studying the structural equilibrium behavior of these two phases by electron microscopy. The reported results indicate that OCP and HAP are pure states at the beginning and ending of the hydrolysis. A controlled analysis of the reported synthesis method will allow to perform detailed analyzes of the OCP–HAP interface.

Acknowledgements

We thank Dr. R. Velázquez Castillo and Dr. E.R. García for fruitful comments. We also thank the technical support from L. Rendón Vazquez, R. Hernández Reyes, P. Mexia Hernández, C. Flores Morales, S. Tehuacanero Núñez, J. Cañetas Ortega, A. Gomez Cortés, M. Aguilar Franco and G. Mondragón Galicia. We also thank the economical support from DGAPA-UNAM under the project IN111808.

References

- [1] J. Elliott, Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Phosphates, Elsevier, Amsterdam, 1994.
- [2] X. Lu., Y. Leng, Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid, *Biomaterials* 26 (2005) 1097–1108.
- [3] M.S.A. Johnsson, G.H. Nancollas, The role of brushite and octacalcium phosphate in apatite formation, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 3 (1992) 61–82.
- [4] P.T. Cheng, Formation of octacalcium phosphate and subsequent transformation to hydroxyapatite at low supersaturation: a model for cartilage calcification, *Calcif. Tissue Intern.* 40 (1987) 339–343.
- [5] M. Iijima, H. Kamemizu, N. Wakamatsu, T. Goto, Y. Doi, Y. Moriwaki, Transition of octacalcium phosphate to hydroxyapatite in solution at pH 7.4 and 37 °C, *J. Cryst. Growth* 181 (1997) 70–78.
- [6] R.Z. LeGeros, Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine, S. Karger, AG, Basel, 1991.
- [7] L.C. Chow, E.D. Eanes (Eds.), Octacalcium Phosphate. Monographs in Oral Science, vol. 18, S. Karger, AG, Basel, 2007.
- [8] W.E. Brown, N. Eidelman, B. Tomazic, Octacalcium phosphate as a precursor in biomineral formation, *Adv. Dent. Res.* 1 (1987) 306–313.
- [9] W. Balluffi, R.M. Allen, S.W. Craig Carter, Kinetics of Materials, Wiley-Interscience, A. John Wiley and Sons, Inc, New York, 2005.
- [10] R.A. Young, W.E. Brawn, in: G.H. Nancollas (Ed.), Biological Mineralization and Demineralization, Springer, Berlin, 1992 p. 119.
- [11] G.C. Allen, E. Ciliberto, I. Fragalà, G. Spoto, Surface bulk study of calcium phosphate bioceramics obtained by metal organic chemical vapor deposition, *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. B* 116 (1996) 457–460.
- [12] R. Xin, Y. Leng, N. Wang, In situ TEM examinations of octacalcium phosphate to hydroxyapatite transformation, *J. Cryst. Growth* 289 (2006) 339–344.
- [13] S. Graham, P.W. Brown, Reactions of octacalcium phosphate to form hydroxyapatite, *J. Cryst. Growth* 165 (1996) 106–115.
- [14] M. Iijima, Y. Moriwaki, Effects of ionic inflow, organic matrix on crystal growth of octacalcium phosphate; relevant to tooth enamel formation, *J. Cryst. Growth* 198/199 (1999) 670–676.
- [15] J. Rodriguez-Carbajal, Laboratoire Leon Brillouin (CEA-CNRS), France, e-mail juan@llb.saclay.cea.fr.
- [16] P. Thompson, D.E. Cox, J.B. Hasting, Rietveld refinement of debye-scherrer synchrotron X-ray data from Al_2O_3 , *J. Appl. Cryst.* 20 (1987) 79–83.
- [17] R.A. Young, P. Desai, Crystallite Size and Microstrain Indicators in Rietveld Refinement, *Arch. Nauki Mater (Arch. Mater. Sci.)* 10 (1989) 71–90.
- [18] W.E. Brown, Octacalcium phosphate and hydroxyapatite: crystal structure of octacalcium phosphate, *Nature* 196 (1962) 1048–1050.
- [19] M.I. Kay, R.A. Young, A.S. Posner, Crystal structure of hydroxyapatite, *Nature* 204 (1964) 1050–1053.
- [20] International Tables for X-ray crystallography, International Union of Crystallography, The Kynoch Press, Birmingham, UK, 1952.
- [21] X. Lu, Y. Wang, J. Wang, S. Qu, J. Weng, R. Xin, Y. Leng, Calcium phosphate crystal growth under controlled environment through urea hydrolysis, *J. Cryst. Growth* 297 (2006) 396–402.
- [22] E.I. Suvorova, P.A. Stadelmann, P.A. Buffat, HRTEM simulation in determination of thickness and grain misorientation for hydroxyapatite crystals, *Crystallogr. Rep.* 49 (2004) 343–352.
- [23] M.E. Fernández, C. Zorrilla-Cangas, R. Garcia-García, J.A. Ascencio, J. Reyes-Gasga, New model for the hydroxyapatite–octacalcium phosphate interface, *Acta Crystal. B* 59 (2003) 175–181.

REFERENCIAS

1. J. Elliott, Structure and chemistry of the apatites and other calcium phosphates, Elsevier, Amsterdam, 1994.
2. X. Lu., Y. Leng, Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. *Biomaterials* 26 (2005) 1097-1108.
3. M. S. A. Johnsson and G. H. Nancollas, The role of brushite and octacalcium phosphate in apatite formation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 3 (1992) 61-82.
4. R. Z. LeGeros, Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine, S. Karger, AG. Basel, 1991.
5. G. L. Gardner and G. H. Nancollas. *Journal of Phys. Chem.* 87, 4699 (1983).
6. W. Wu, R. Tang, M. Haas, and G. H. Nancollas. Constant Composition Dissolution of Mixed Phases I. Synthetic Calcium Phosphates. *Journal of Colloid and Interface Science* 244 (2001) 347-352.
7. P. T. Cheng, Formation of octacalcium phosphate and subsequent transformation to hydroxyapatite at low supersaturation: A model for cartilage calcification. *Calcif. Tissue Intern.* 40 (1987) 339-343.
8. M. Iijima, H. Kamemizu, N. Wakamatsu, T. Goto, Y. Doi, Y. Moriwaki, Transition of octacalcium phosphate to hydroxyapatite in solution at pH 7.4 and 37 °C. *J. Crystal Growth* 181 (1997) 70-78.
9. L. C. Chow and E. D. Eanes (Eds), Octacalcium phosphate. *Monographs in Oral Science* Vol. 18, S. Karger, AG. Basel 2007.

10. L-J. Zhang, H-G. Liu, R-J. Zhang, L. Zhang, D-J. Qian, Y-D. Mu, X-L. Yu, X-S. Feng. The mineralization process of calcium phosphate induced by the LB films of porphyrin. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 257–258 (2005) 307–312.
11. W. E. Brown, N. Eidelman and B. Tomazic, Octacalcium phosphate as a precursor in biomineral formation. *Adv. Dent. Res.* 1 (1987) 306-313.
12. W. Ballufi, R. M. Allen, S. W Craig Carter. *Kinetics of materials*, Wiley-Interscience, A. John Wiley and Sons, Inc., New York, 2005.
13. S. Graham and P. W. Brown. Reactions of octacalcium phosphate to form hydroxyapatite. *J. Crystal Growth.* 165 (1996) 106-115.
14. R. A. Young and W. E. Brown, in: G. H. Nancollas (Ed), *Biological mineralization and Demineralization*. Springer, Berlin, 1992, p.119.
15. S. M. Schmidt, J. McDonald, E. T. Pineda, A. M. Verwilst, Y. Chen, R. Josephs, A. E. Ostafin. Surfactant based assembly of mesoporous patterned calcium phosphate micron-sized rods. *Microporous and Mesoporous Materials* 94 (2006) 330–338.
16. R. Xin, Y. Leng, J. Chen, Q. Zhang. A comparative study of calcium phosphate formation on bioceramics in vitro and in vivo. *Biomaterials* 26 (2005) 6477–6486.
17. J. Moradian-Oldak. Mini-review: Amelogenins: assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biology* 20 (2001) 293-305.
18. R.M. Shelton, Y. Liu, P.R. Cooper, U. Gbureck, M.J. German, J.E. Barralet. Bone marrow cell gene expression and tissue construct assembly using octacalcium phosphate microscaffolds. *Biomaterials* 27 (2006) 2874–2881.

19. S. Kamakura, Y. Sasano, O. Suzuki. Synthetic octacalcium phosphate (OCP) is an effective scaffold to regenerate bone. *International Congress Series* 1284 (2005) 290-295
20. O. Suzuki, S. Kamakura, T. Katagiri, M. Nakamura, B. Zhao, Y. Honda, R. Kamijo. Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite. *Biomaterials* 27 (2006) 2671–2681.
21. X. Lu, Z. Zhao, Y. Leng. Biomimetic calcium phosphate coatings on nitric-acid-treated titanium surfaces. *Materials Science and Engineering C* 27 (2007) 700–708.
22. P. Habibovic, J. Li, C. M. van der Valk, G. Meijer, P. Layrolle, C. A. van Blitterswijk, K. de Groot. Biological performance of uncoated and octacalcium phosphate-coated Ti6Al4V. *Biomaterials* 26 (2005) 23–36
23. R. J. Dekkera, J. D. de Bruijn, M. Stigter, F. Barrere, P. Layrolle, C. A. van Blitterswijk. Bone tissue engineering on amorphous carbonated apatite and crystalline octacalcium phosphate-coated titanium discs. *Biomaterials* 26 (2005) 5231–5239
24. H. Wang, C. Lin, R. Hu. Effects of structure and composition of the CaP composite coatings on apatite formation and bioactivity in simulated body fluid. *Applied Surface Science* 255 (2009) 4074–4081
25. R. Horváthová, L. Müller, A. Helebrant, P. Greil, F. A. Müller. In vitro transformation of OCP into carbonated HA under physiological conditions. *Materials Science and Engineering C* 28 (2008) 1414–1419
26. W. E. Brown, Octacalcium phosphate and hydroxyapatite: crystal structure of octacalcium phosphate, *Nature* 196 (1962) 1048-1050.

27. W. E. Brown, J. P. Smith, J. R. Lehr, A.W. Frazier. Crystallographic and chemical relations between octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Nature* 196 (1962) 1051-1055.
28. H. Wang, C. Lin, R. Hu. Effects of structure and composition of the CaP composite coatings on apatite formation and bioactivity in simulated body fluid. *Applied Surface Science* 255 (2009) 4074–4081.
29. D. R. Taves. Similarity of octacalcium phosphate and hydroxyapatite structures. *Nature* 200 (1963) 1312-1313.
30. A. S. Posner, A. Perloff and A. F. Diorio. Refinement of the hydroxiapatite structure. *Acta Cryst.* 11 (1958) 308-309.
31. M. I. Kay, R. A. Young and A. S. Posner, Crystal structure of hydroxyapatite, *Nature* 204 (1964) 1050-1053.
32. E. I. Survorova, P. A. Buffat. Electron diffraction and high resolution transmission electron microscopy in the characterization of calcium phosphates precipitation from aqueous solutions under biomineralization conditions. *Eur. Cell Mater.* 1 (2001) 27-42.
33. N. J. Crane, V. Popescu, M. D. Morris, P. Steenhuis, M. A. Ignelzi Jr. Raman spectroscopy evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization. *Bone* 39 (2006) 434-442.
34. Marc D. Grynpas. Transient precursor strategy or very small biological apatite crystals? *Bone* 41 (2007) 162-164.
35. M. Iijima, Y. Moriwaki. Effects of ionic inflow and organic matrix on crystal growth of octacalcium phosphate; relevant to tooth enamel formation. *J. Crystal Growth* 198/199 (1999) 670–676.

36. M. Iijima, Y. Moriwaki. Lengthwise and oriented growth of octacalcium phosphate crystal in polyacrylamide gel in a model system of tooth enamel apatite formation. *Journal of Crystal Growth* 194 (1998) 125–132.
37. M. Iijima, K. Hayashi, Y. Moriwaki. Effects of the Ca^{2+} and PO_4^{3-} ion flow on the lengthwise growth of octacalcium phosphate in a model system of enamel crystal formation with controlled ionic diffusion. *Journal of Crystal Growth* 234 (2002) 539–544.
38. Falini, S. Fermani, A. Ripamonti. Oriented crystalization of octacalcium phosphate into beta-chitin scaffold. *Journal of Inorganic Biochemistry* 84 (2001) 255–258.
39. Q. Liu, J. Ding, F. K. Mante, S. L. Wunder, G. R. Baran. *Biomaterials* 23 (2002) 3103–3111.
40. G. Daculsi, R. Z. LeGeros and D. Mitre. Crystal dissolution of biological and ceramic apatite. *Calcif. Tissue Int.* 45 (1989) 95-103.
41. E. I. Suvorova, H. E. Lundager Madsen. Observation by HRTEM the hydroxyapatite-octacalcium phosphate interface in crystals grown from aqueous solutions. *Journal of Crystal Growth* 198/199 (1999) 677–681.
42. M. E. Fernandez, C. Zorrilla-Cangas, R. Garcia-Garcia, J. A. Ascencio and J. Reyes-Gasga, New model for the hydroxyapatite-octacalcium phosphate interface. *Acta Crystal. B* 59 (2003) 175-181.
43. R. Xin, Y. Leng and N. Wang, In situ TEM examinations of octacalcium phosphate to hydroxyapatite transformation. *Journal of Crystal Growth* 289 (2006) 339-344.
44. G. H. Nancollas, J. Zhang. Formation and dissolution mechanisms of calcium phosphates in aqueous systems. *Hydroxyapatite and related*

- materials. P. W. Brown and B. Constantz editors. CRC Press (1995) 73-81.
45. M. P. Ginebra. Tesis. Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico-alfa para aplicaciones quirúrgicas. Universidad Politécnica de Cataluña. 1996.
46. O. Sohnel. Electrolyte crystal-aqueous solution interfacial tensions from crystallization data. *Journal of Crystal Growth* 57 (1982) 101-108.
47. B. C. Bunker, P. C. Rieke, B. J. Tarasevich, A. A. Campbel, G. E. Fryxell, G. L. Graff, L. Song, J. Liu, J. W. Virden, G. L. McVay. Ceramic thin-film formation on functionalized interfaces through biomimetic processing. *Science* 264 (1994) 48-55.
48. B. B. Tomazic, M. S. Tung, T. M. Gregory and W. E. Brown. Mechanism of hydrolysis of octacalcium phosphate. *SEM* 3 (1989) 119-127.
49. Conceptos básicos de hidrólisis. McGraw Hill (2004).
50. C. Kittel, *Introduction to the Solid State Physics*, séptima edición, John Wiley & Sons, Nueva York, E. U. A., 1996.
51. *International Tables for Crystallography Vol. A, Space Group Symmetry*, Segunda edición, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda 1989.
52. B. E. Warren, *X-ray Diffraction*, Addison-Wesley Pub. Co., Reading Mass. E. U. A., 1969.
53. L. V. Azároff, R. Kaplow, N. Kato, A. J. C. Wilson, y R. A. Young, *X-ray Diffraction*, McGraw Hill Book Co., Nueva York, E. U. A., 1974.

54. H. P. Klug, L. E. Alexander, *X-ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials*, Segunda edición, John Wiley & Sons, Nueva York, E. U. A., 1974.
55. B. D. Cullity. *Elements of X-ray Diffraction*. USA. Addison-Wesley Publishing Co. Inc., 1967.
56. R. A. Castellanos. *Difracción de Rayos-X: Método de Polvos*. México. McGraw-Hill, 1990
57. M. V. Laue, *Ann. Phys.* 41, 971 (1913).
58. W. L. Bragg, *Proc. Cambridge Phil. Soc.* 17, 43 (1913).
59. Esbaide Adem Ed. *Una Ventana hacia la investigación en física*. Mexico. Fondo de Cultura Económica, UNAM, Instituto de Física. 2000.
60. H. M. Rietveld, *J. Appl. Crystallogr.* 2, 65 (1969).
61. R. A. Young, A. Sakthivel, T. S. Moss, and C. O. Paiva-Santos, *J. Appl. Crystallogr.* 28, 366 (1995).
62. R. B. von Dreele, y A. C. Larson, *LANSCE Newsletter* No 4, invierno de 1988. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, E.U.A.
63. Y.-I Kim, y F. Izumi, *Journal of the Ceramic Society of Japan, Int. Edition*, 102. 404 (1994).
64. Ch. Baerlocher, *Proceedings of the 6th International Zeolite Conference*, 1984, Butterworth Scientific.
65. R. A. Young, School of Physics, Georgia Institute of Technology, Atlanta Georgia 30332-0430, E. U. A., Tel. (404) 894-5201, Fax. (404) 853-9958.

66. J. Rodriguez-Carbajal, Laboratoire Leon Brillouin (CEA-CNRS), France. e-mail juan@llb.saclay.cea.fr.
67. H. Seemann, *Ann. Phys.* 59, 455 (1919).
68. H. Boohlin, *Ann. Phys.* 61, 421 (1920).
69. D. M. North y C. N. J. Wagner, *J. Appl. Crystallogr.* 2, 149 (1969).
70. D. B. Williams and C. B. Carter, *Transmission Electron Microscopy. A Text Book for Materials Science*. N.Y. Plenum Press, 1996.
71. M. J. Yacamán, y J. Reyes-Gasga. *Microscopía Electrónica, Una Visión del Microcosmos*. México. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Fondo de Cultura Económica, 1995.
72. J.I. Goldstein. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. N.Y. Plenum Press, 1984.
73. R. Kessel. *La Microscopía Electrónica de Barrido en Biología*. España. Edit. Dossat S.A., 1976.
74. J. L. Aragón. *Notas: Fundamentos de Cristalografía*. México. Sociedad Mexicana de Cristalografía A. C., 1999.
75. Digital micrograph. Software para análisis y tratamiento de imágenes de MET. GATAN.
76. A. Bigi, E. Boanini, M. Borghi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, N. Roveri. *Journal of Inorganic Biochemistry* 75 (1999) 145–151
77. Pierre Stadelmann. *Centre Interdépartemental de Microscopie Electronique of the Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne*.

ANEXOS

