



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

“CONTROL DE LA MACROPOROSIDAD DE UN MATERIAL
COMPUESTO ORGÁNICO-INORGÁNICO A BASE DE
HIDROXIAPATITA: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN.”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE MATERIALES

P R E S E N T A:
ING. SUSANA ALONSO SIERRA

TUTOR:
Dr. Eric Mauricio Rivera Muñoz
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA (CFATA)
MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Beatriz Marcela Millán Malo
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA (CFATA)
Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO (UAQ)

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

Quisiera que las siguientes líneas sirvieran como reconocimiento a las instituciones y personas que hicieron posible la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al proyecto UNAM-PAPIIT No. IN107311 por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto.

Al comité tutorial, como tutor principal el Dr. Eric Mauricio Rivera Muñoz y a mis asesores el Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo a la Dra. Beatriz Marcela Millán Malo.

A la M. en I. Q. Alicia del Real López por su colaboración en la obtención de las imágenes de microscopía electrónica de barrido, así como por su enorme paciencia para enseñarme el manejo del microscopio.

A la Dra. Genoveva Hernández Padrón por los análisis de Espectroscopía Infrarroja.

A la Dra. Beatriz Marcela Millán Malo por los análisis de difracción de rayos X y por formar parte del comité tutorial

A la M.C.A. Carmen Leticia Peza Ledesma por los ensayos de pruebas mecánicas y por su colaboración en la interpretación de los espectros de infrarrojo.

Al M.C. Guillermo Vázquez Sánchez por su apoyo técnico computacional.

Este trabajo está dedicado con especial cariño a Julio, por alentarme a iniciar este proyecto, y apoyarme hasta concluirlo.

A mis padres, quienes me mostraron que el verdadero sentido de la vida es el conocimiento, sin ustedes no estaría aquí, gracias por creer en mí.

A Gaby, Enrique, Talía y Monse porque siempre han formado parte de mis éxitos.

A todas aquellas personas del CFATA que se dieron un tiempo para guiarme, escucharme, orientarme, regañarme o hacerme reír.

Contenido

Índice de figuras	6
Resumen.....	9
Introducción.....	10
CAPÍTULO I	12
Marco teórico.....	12
1.1 El tejido óseo.....	12
1.1.1 Constituyentes.....	14
1.1.2 Composición química.....	14
1.2 Matriz orgánica	15
1.2.1 Fibras de colágeno	15
1.2.2 Reacciones de precipitación de las proteínas	19
1.2.3 Colágeno como biomaterial	20
1.2.4. Gelatina	21
1.2.4.1 <i>Proceso obtención grenetina</i>	23
1.3 Fase inorgánica.....	24
1.3.1 Estructura del tejido óseo	26
1.3.2 Propiedades mecánicas	28
1.4 Biomateriales.....	30
1.4.1 Proceso de fabricación.....	31
Antecedentes.....	34
Objetivos.....	39
Hipótesis.....	40
Justificación.....	41
CAPÍTULO II.....	42
Desarrollo experimental.....	42
2.1 Materiales y métodos.....	44
2.2 Preparación de las muestras cerámicas.....	45
2.3 Moldeado.....	45
2.3 Calcinación del polímero y sinterizado.....	46

2.4	Preparación de la fase orgánica.....	47
CAPÍTULO III.....		53
Técnicas de caracterización.....		53
3.2	Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	53
3.2.1	Preparación y análisis de muestras.....	58
3.3	Microscopía electrónica de barrido. [48].....	59
3.3.1	Preparación y análisis de las muestras.....	63
3.4	Espectroscopía de dispersión de energía (EDS) [49].....	63
3.4.1	Preparación y análisis de muestras.....	65
3.5	Difracción de rayos x [50].....	65
3.5.1	Preparación y análisis de las muestras.....	68
3.6	Pruebas mecánicas.....	68
3.6.1	Preparación y análisis de las muestras.....	69
CAPÍTULO IV.....		71
Resultados y discusión.....		71
4.1	Microscopia electrónica de barrido.....	73
4.2	Espectroscopía de energía dispersiva.....	79
4.3	Difracción de Rayos X (XRD).....	80
4.4	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	81
4.5	Propiedades mecánicas.....	88
CAPÍTULO V.....		100
Conclusiones y perspectivas.....		100
Perspectivas.....		102
Referencias.....		103

Índice de figuras

<i>Figura 1: Distribución de los constituyentes del tejido óseo.</i>	14
<i>Figura 2: Colágeno tipo I [11]</i>	16
<i>Figura 3: Conformación del hueso [23]</i>	27
<i>Figura 4: Esquema general del método gelcasting para producir piezas cerámicas.</i>	32
<i>Figura 5: Esquema general del proceso Gel Casting Modificado</i>	43
<i>Figura 6: Gráfica del tratamiento térmico realizado a las piezas de HAp</i>	47
<i>Figura 7: Esquema general para la obtención del material compuesto.</i>	49
<i>Figura 8: Estiramiento en el eje del enlace.</i>	54
<i>Figura 9: Deformación fuera del eje del enlace.</i>	54
<i>Figura 10: Estiramiento de molécula diatómica.</i>	55
<i>Figura 11: Distintos modos de vibración.</i>	56
<i>Figura 12: El estado excitado E2 es el estado al que llega un enlace que ha absorbido un fotón de radiación electromagnética de igual frecuencia o energía al del enlace en cuestión. E1 representa la energía de la frecuencia de vibración normal del enlace.</i>	57
<i>Figura 13: Esquema general de un microscopio electrónico de barrido (SEM)</i>	61
<i>Figura 14: Diferentes formas de radiación en el SEM.</i>	62
<i>Figura 15: Ondas de rayos X dispersadas de manera ordenada por una estructura cristalina.</i>	66
<i>Figura 16: Esquemización de la Ley de Bragg.</i>	67
<i>Figura 17: Muestras de material compuesto orgánico-inorgánico base hidroxiapatita obtenidas mediante el proceso Gelcasting modificado. La escala se presenta en cm.</i>	71
<i>Figura 18: Micrografía a 100X de las esferas de polímero utilizadas para la formación de los poros en las piezas cerámicas.</i>	72
<i>Figura 19: Micrografía SEM de una muestra de HAp obtenida por el PGCM antes del tratamiento térmico, a 200X y 10 KeV y a 2000X y 20 KeV.</i>	73
<i>Figura 20: Micrografía SEM de las muestras porosas obtenidas por el PGCM después de tratamiento térmico a 85X y 20kv.</i>	74

<i>Figura 21: Micrografía SEM a 2000X de piezas cerámicas de HAp con micro y macro porosidad interconectada.</i>	75
<i>Figura 22: Micrografía SEM del material compuesto orgánico-inorgánico base HAp/grenetina.</i>	76
<i>Figura 23: Micrografía SEM a 10,000X del material compuesto orgánico-inorgánico base HAp/colágeno.</i>	78
<i>Figura 24: Difractograma de EDS y tabla de porcentajes atómicos en un mapeo general de una muestra obtenida por PGCM después del tratamiento térmico.</i>	79
<i>Figura 25: Difractogramas correspondientes a (a) hidroxiapatita inicial, (b) muestra obtenida por el proceso gelcasting modificado y (c) muestra obtenida por el proceso gelcasting modificado después del tratamiento térmico.</i>	81
<i>Figura 26: Espectros FTIR de a) hidroxiapatita antes del PGCM, b) microesferas de PMMA, c) posterior al moldeado de las piezas y d) al finalizar el tratamiento térmico.</i>	82
<i>Figura 27: Espectros FTIR de a) hidroxiapatita al finalizar el tratamiento térmico, b) grenetina y c) material compuesto hidroxiapatita-grenetina.</i>	85
<i>Figura 28: Espectros FTIR de a) hidroxiapatita al finalizar el tratamiento térmico, b) colágeno y c) material compuesto hidroxiapatita-colágeno.</i>	87
<i>Figura 29: Comportamiento típico de un material compuesto orgánico-inorgánico base HAp, el cual presenta un comportamiento típico de un material celular.</i>	88
<i>Figura 30: Materiales celulares de celda abierta y celda cerrada. a) Espuma de níquel de celda abierta b) espuma metálica de celda cerrada. [59]</i>	89
<i>Figura 31: Micrografía SEM a 15,000X del material compuesto orgánico-inorgánico base HAp, presentando estructura de material celular</i>	90
<i>Figura 32: Curva tensión-deformación a compresión para una espuma polimérica. Pueden producirse grandes deformaciones a compresión, ya que la espuma absorbe gran cantidad de energía cuando es aplastada. [60]</i>	91
<i>Figura 33: Esquema del comportamiento del material compuesto base hidroxiapatita obtenido, el cual representa un material celular. a) Material sin carga, b) "doblamiento" de las paredes de la celda bajo esfuerzo de</i>	

<i>compresión, b) deformación plástica de las celdas, c) esfuerzo máximo, d) colapso de las celdas e) densificación del material.</i>	<i>92</i>
<i>Figura 34: Esfuerzo a la compresión de materiales compuestos base HAp con diferentes concentraciones de grenetina como fase orgánica.</i>	<i>94</i>
<i>Figura 35: Esfuerzo a la compresión de materiales compuestos base HAp E con diferentes concentraciones de colágeno como fase orgánica.</i>	<i>95</i>
<i>Figura 36: Variación del esfuerzo máximo en compresión con respecto a la concentración de la fase orgánica incluyendo el error experimental.</i>	<i>96</i>
<i>Figura 37: Ajuste de la curva correspondiente al comportamiento del esfuerzo máximo a la compresión con respecto a la concentración de la fase orgánica.</i>	<i>97</i>
<i>Figura 38: Curva tipo sigmoide de Boltzman donde se muestra los parámetros que la definen.</i>	<i>98</i>

Resumen.

Los biomateriales a base de hidroxiapatita (HAp) son estudiados comúnmente debido a la respuesta favorable que presentan al ser utilizados para la sustitución de tejido óseo. Estos materiales deben ser suficientemente porosos para permitir la penetración celular, crecimiento de tejido interno, incursión vascular rápida y suministro de nutrientes. Además, su morfología debe ser diseñada para guiar la formación de nuevo tejido óseo en formas anatómicamente relevantes.

En el presente trabajo se reporta la síntesis de un material compuesto orgánico-inorgánico a base de hidroxiapatita con porosidad controlada. Para obtener piezas de HAp suficientemente porosas se procesó el material por el método gelcasting modificado añadiendo microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) con diferentes diámetros y a diferentes concentraciones, produciendo piezas cerámicas de formas variadas y con diversos tamaños de poro. Posteriormente, fueron sometidas a un tratamiento térmico para eliminar el polímero y sinterizar las partículas de HAp. Las muestras se analizaron antes, durante y después del proceso gelcasting modificado mediante las técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM), análisis elemental mediante espectroscopía de energía dispersiva (EDS), Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos X (XRD). Lo anterior con el fin de asegurarse que se mantienen las propiedades físicas y químicas de la biocerámica durante y después del proceso.

Una vez obtenidas muestras cerámicas con diferentes formas y porosidades, 2 fases orgánicas diferentes, colágeno extraído de cola de bovino y grenetina comercial, fueron añadidas a la matriz cerámica para formar el material compuesto que contiene las dos fases, orgánica e inorgánica. Lo anterior condujo a un incremento en las propiedades mecánicas de manera sinérgica, aumentando la resistencia mecánica a la compresión de las muestras en varios órdenes de magnitud.

Introducción.

Desde el punto de vista de la Ciencia e ingeniería de Materiales, el tejido óseo es considerado un material compuesto orgánico-inorgánico. La fase inorgánica está compuesta principalmente por cristales de fosfatos de calcio, dentro de los cuales, la hidroxiapatita (HAp) es la más abundante e importante. Por esta razón, la investigación básica y aplicada en el campo de los biomateriales, se ha enfocado en el desarrollo de métodos de síntesis y procesamiento de cerámicas a base de fosfatos de calcio y, en particular, de HAp. Dentro de este campo de estudio, se ha encontrado que el control de la macro y micro porosidad es un factor importante para mejorar la eficiencia de un material implantado [1]. La estructura del tejido óseo varía dependiendo de su localización en el cuerpo. La selección de la configuración de un biomaterial apropiado depende del sitio anatómico, de la carga mecánica presente en ese sitio y la velocidad de incorporación deseada. Idealmente, estos materiales deben ser suficientemente porosos para permitir la penetración celular, crecimiento de tejido interno, incursión vascular rápida y suministro de nutrientes. Además, la matriz debe ser diseñada para guiar la formación de nuevo tejido óseo en formas anatómicamente relevantes y su cinética de degradación debe ser tal que conserve sus propiedades físicas por lo menos 6 meses. [2]

Así pues, el control de la porosidad a escalas micro y macroscópicas es fundamental en el desarrollo de nuevas biocerámicas y sus aplicaciones. Por esta razón, el presente trabajo se enfoca en el desarrollo de una metodología para controlar dicha porosidad, en correlación con las propiedades físico-químicas y mecánicas del material.

El documento está formado por cuatro capítulos; en el capítulo I se hace una revisión acerca de los constituyentes del tejido óseo, se describen las

propiedades físicas y químicas de la matriz orgánica y la fase inorgánica presente en el hueso. Se presenta el estado del arte en cuanto al estudio y desarrollo de los biomateriales y se resalta la importancia de las biocerámicas a base de HAp; además, se realiza una recopilación sobre la obtención de implantes óseos por diversos métodos.

El Capítulo II hace referencia al desarrollo experimental realizado para obtener el material compuesto orgánico-inorgánico. Se comienza con la descripción de la materia prima utilizada durante el proyecto, posteriormente se describe la preparación de las piezas cerámicas, la obtención y elaboración de las dos fases orgánicas utilizadas, y por último, se detalla la integración de dichas fases para conseguir el material compuesto.

En el Capítulo III se hace una revisión sobre las técnicas de caracterización utilizadas: Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), Microscopía electrónica de Barrido (SEM), Espectroscopía de Energía Dispersiva (EDS), Difracción de Rayos X (XRD) y la determinación de las propiedades mecánicas en modo de compresión; además, se describe el proceso de preparación de las muestras para dichas caracterizaciones.

Los resultados obtenidos por las técnicas descritas previamente y la discusión de estos se llevan a cabo en el Capítulo IV.

Para finalizar, en el Capítulo V, se presentan las conclusiones del trabajo de investigación, así como propuestas de trabajo a futuro.

CAPÍTULO I

Marco teórico.

1.1 El tejido óseo

El tejido óseo es un tejido conjuntivo especializado en la función esquelética y en la función de sostén, cuyas propiedades especiales se deben a la composición de su matriz, en la cual se depositan sales de calcio y otros minerales como magnesio, sodio y fósforo. [3]

El tejido óseo constituye aproximadamente el 18% del peso corporal, siendo el tejido especializado que caracteriza a los vertebrados; tiene una notable combinación de propiedades físicas: alta resistencia a la tracción y a la compresión, mientras que al mismo tiempo tiene cierta elasticidad y la ventaja de ser un material relativamente ligero. A todos los niveles de organización de los huesos, desde su forma macroscópica hasta su estructura

submicroscópica, el modo de estar constituidos les asegura la máxima resistencia con la mayor economía del material y el peso mínimo [4], desempeña seis funciones básicas:

- a. **Sostén.** El esqueleto es la estructura del organismo que da sostén a los tejidos blandos y provee los puntos de inserción para los tendones de la mayoría de los músculos esqueléticos.
- b. **Protección.** El esqueleto protege de las lesiones a los órganos internos más importantes. Por ejemplo, los huesos del cráneo protegen al cerebro, las vértebras a la médula espinal y la caja torácica al corazón y los pulmones.
- c. **Asistencia en el movimiento.** La mayoría de los músculos esqueléticos se fija a los huesos; cuando se contraen, traccionan de éstos para producir el movimiento.
- d. **Homeostasis mineral.** El tejido óseo almacena diversos minerales, especialmente calcio y fósforo, lo cual contribuye a la solidez del hueso. Los huesos liberan hacia la sangre los minerales necesarios para mantener su equilibrio (homeostasis) y distribuirlos a otras partes del organismo.
- e. **Producción de células sanguíneas.** Dentro de algunos huesos, un tejido conectivo denominado *médula ósea roja* produce glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, proceso llamado hemopoyesis. La médula ósea roja consta de células sanguíneas en desarrollo, adipocitos, fibroblastos, y macrófagos dentro de un tejido de sostén (estroma) formado por fibras reticulares. Se encuentra en los huesos en desarrollo del feto y en algunos huesos del adulto, como la pelvis, las costillas, el esternón, las vértebras, el cráneo y los extremos de los huesos largos del brazo y del muslo.
- f. **Almacenamiento de triglicéridos.** La *médula ósea amarilla* está constituida principalmente por adipocitos, los cuales almacenan triglicéridos. Éstos son una reserva potencial de energía química. [5]

Los huesos y los dientes son organismos vivos compuestos de sustancias minerales y tejidos; estos últimos consisten de células, sustancias grasas, polímeros naturales (como polisacáridos, colágeno y polifosfatos) y otras sustancias. Si bien las propiedades del tejido óseo, así como las proporciones de las sustancias que los forman, varían de acuerdo con las diferentes partes del esqueleto, en general, podemos considerar que contienen alrededor de dos terceras partes de material inorgánico y una tercera parte de material orgánico.

1.1.1 Constituyentes

El tejido óseo está compuesto por una fase mineral que ocupa un 69% de su peso total, un 9% de agua y un 22% de una matriz orgánica, la cual se compone, a su vez, básicamente de colágeno (90-96%), Figura 1.

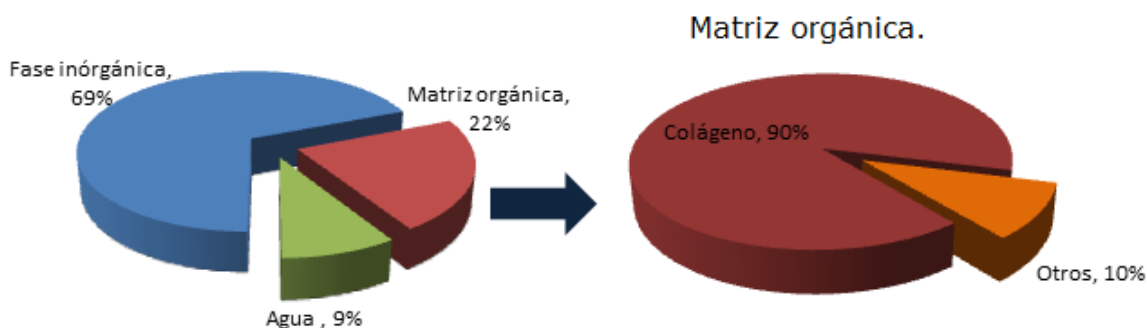


Figura 1: Distribución de los constituyentes del tejido óseo.

1.1.2 Composición química

La matriz ósea extracelular se compone de una matriz orgánica y de sales inorgánicas. La matriz orgánica está formada por fibras de colágeno incluidos en una sustancia fundamental. En adultos, el colágeno representa alrededor del 90% de la matriz orgánica. [6]

1.2 Matriz orgánica

1.2.1 Fibras de colágeno

El colágeno forma parte de una gran familia de proteínas fibrosas que se encuentran en todos los animales pluricelulares. Es sintetizada por células que se encuentran dispersas en el tejido conjuntivo como son fibroblastos, osteoblastos, condroblastos e inmersas en una matriz extracelular compuesta de polisacáridos (glucosaminoglucanos) [7]. Las fibrillas de colágeno se hallan dispuestas de modos diferentes que dependen de la función biológica del tipo particular de tejido conjuntivo. En los tendones las fibras de colágeno están dispuestas en haces paralelos que proporcionan estructuras de gran resistencia, pero de poca o nula capacidad de estiramiento. El material orgánico de la córnea del ojo es colágeno casi puro. [8]

En los tejidos de los vertebrados existen en 27 diferentes formas [9], cada una de ellas predomina en un tejido específico. Estructuralmente, comparten una triple hélice y ciertas variaciones entre ellos se reducen a la longitud de la fracción no helicoidal, la extensión de la hélice y el número y naturaleza de los carbohidratos unidos a la triple hélice [10]

La distribución en el organismo de los diferentes tipos de colágeno se muestra en la Tabla 1.

El colágeno tipo I, Figura 2, es la proteína extracelular más abundante del tejido óseo. La molécula que le corresponde (tropocolágena) está formada por tres cadenas α de 300 nm de longitud y 1.4 nm de diámetro. Estas tres cadenas son hélices: dos de ellas son idénticas, con igual secuencia de aminoácidos y se denotan como $\alpha(1)$ y la tercera cadena se denota como $\alpha(2)$ la cual tiene una secuencia de aminoácidos diferente. La secuencia de aminoácidos de estas cadenas α se puede describir así: $(\text{Gly-X-Y})_n$, donde Gly

representa un residuo de glicina, X es frecuentemente prolina e Y una hidroxiprolina.

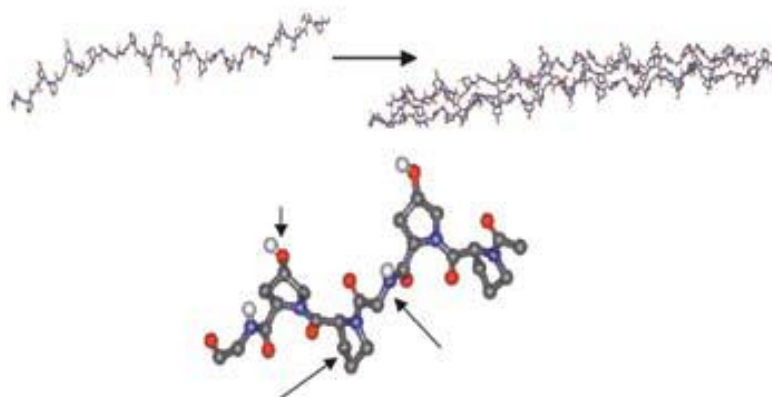


Figura 2: Colágeno tipo I [11]

Aunque los colágenos de diferentes especies difieren algo en secuencia aminoácida, la mayor parte contiene alrededor del 35% de glicocola y 11% de alanina; en este aspecto se parecen a las β -queratinas. Los colágenos se diferencian en que contienen alrededor del 12% de prolina y un 9% de hidroxiprolina, un aminoácido que se encuentra raramente en proteínas distintas al colágeno. [8]

La proporción de aminoácidos para colágeno tipo I se presenta en la Tabla 2. Las moléculas de colágeno tipo I se organizan en fibras o fibrillas que presentan una fuerza de tensión muy alta y proporcionan la base estructural del hueso, piel, arterias y venas, intestinos y cápsulas fibrosas de algunos órganos. El colágeno tipo I tiene una alta estabilidad térmica debido principalmente al arreglo estructural que presenta, y a los enlaces químicos débiles y fuertes, como los puentes de hidrógeno formados por las moléculas de agua. Dichos enlaces se encuentran entre las cadenas que forman la triple hélice entre los grupos amino y carboxilo del esqueleto de la cadena polipeptídica.

Tabla 1: Distribución de los diferentes tipos de colágeno en el organismo. [9]

Tipo	Subfamilia	Distribución en los tejidos
I	Fibrilar	Piel, hueso, tendón, ligamento, córnea
II	Fibrilar	Cartílago
III	Fibrilar	Piel, vasos sanguíneos, intestino, útero
IV	Reticular	Membranas basales
V	Fibrilar	Hueso, piel, cornea, placenta
VI	Reticular	Hueso, cartílago, córnea, piel, vasos sanguíneos
VII	Fibrillas de anclaje	Piel, vejiga, mucosa oral, cordón umbilical
VIII	Reticular	Vasos sanguíneos, huesos, cerebro, corazón riñón piel, cartílago
IX	Colágeno fibrilar asociado a hélices triples interrumpidas	Cartílago, córnea
X	Reticular	Cartílago hipertrófico
XI	Fibrilar	Cartílago, discos vertebrales
XII	Colágeno fibrilar asociado a hélices triples interrumpidas	Piel, tendón, cartílago
XIII	Transmembrana	Pile, ojo, corazón musculo esquelético
XIV	Colágeno fibrilar asociado a hélices triples interrumpidas	Vasos sanguíneos, hueso, piel, cartílago, ojo, nervio, tendón, útero.
XV	Múltiples triple hélices e interrupciones	Capilares, piel, placenta, riñón, corazón, ovario, testículo
XVI	Colágeno fibrilar asociado a hélices triples interrumpidas	Corazón, riñón, musculo liso, piel
XVII	Transmembrana	Epitelio
XVIII	Múltiples tripe hélices e interrupciones	Membrana perivascular, riñón, hígado, pulmón
XIX	Colágeno fibrilar asociado a hélices triples interrumpidas	Bazo, próstata, riñón, hígado, placenta, colon, piel
XX	Colágeno fibrilar asociado a hélices triples interrumpidas	Epitelio corneal
XXI	Colágeno fibrilar asociado a hélices triples interrumpidas	Vasos sanguíneos, corazón, estómago, riñón, músculo esquelético, placenta
XXII	Colágeno fibrilar asociado a hélices triples interrumpidas	Uniones de tejido
XXIII	Transmembrana	Corazón, retina
XXIV	Fibrilar	Hueso, córnea
XXV	Transmembrana	Cerebro, corazón, testículo, ojo
XXVI	?	Testículo, ovario
XXVII	Fibrilar	Cartílago

La composición para el colágeno tipo I en función de su origen se presenta en la Tabla 3.

Varias moléculas de tropocolágena están alineadas en forma ondulante traslapándose aproximadamente cada cuarta parte de su longitud (67 nm) formando una fibrilla cuyo diámetro es de 20 nm aproximadamente.

Tabla 2: Composición en % de aminoácidos en colágeno tipo I [12]

Abreviatura	Aminoácidos	%
GLY	Glicina	31.90
ALA	Alanina	11.35
VAL	Valina	2.36
LEU	Leucina	2.55
ILE	Isoleucina	1.33
MET	Metionina	0.53
PHE	Fenil alanita	1.39
PRO	Prolina	12.30
HPRO	Hidroxiprolina	10.00
SER	Serina	3.50
THR	Treonina	1.80
TYR	Tirosina	0.45
ASP	Asparginina	4.70
GLU	Glutamina	7.20
ARG	Arginina	4.71
LIS*	Lisina	2.80
HLYS	Hidroxilisina	0.35
HIS	Histidina	0.58

Las moléculas de colágeno tipo I se organizan en fibrillas y fibras que presentan una fuerza de tensión muy alta y proporcionan la base estructural del hueso, la piel, arterias y venas; intestinos y cápsulas fibrosas de algunos órganos. El colágeno tipo I tiene una alta estabilidad térmica debido principalmente al arreglo estructural que presenta, y a los enlaces químicos débiles y fuertes, como los puentes de hidrógeno formados por las moléculas de agua. Dichos enlaces se encuentran entre las cadenas que forman la triple hélice entre los grupos amino y carboxilo del esqueleto de la cadena polipeptídica.

Existen enlaces covalentes entre las triples hélices adyacentes cuando forman fibrillas, y en la región de los espacios, entre el final de una triple hélice y el inicio de otra. [11]

Tabla 3: Análisis comparativo de los aminoácidos contenidos en el colágeno tipo I de diferentes orígenes. [11]

Aminoácidos	(Número de residuos por cada mil)		
	Piel de res	Hueso de res	Hueso humano
Glicina	335.0	314.0	319.0
Alanina	109.7	109.7	113.5
Valina	19.9	21.2	23.6
Leucina	26.9	27.9	25.5
Isoleucina	13.5	12.3	13.3
Metionina	6.2	5.1	5.3
Fenil alanina	13.4	16.3	13.9
Prolina	118.6	118.8	123.4
Hidroxiprolina	92.6	100.8	100.2
Serina	38.4	37.8	35.9
Treonina	18.0	19.7	18.4
Tirosina	5.1	2.9	4.5
Ácido aspártico	49.4	49.8	47.0
Ácido glutámico	71.5	75.8	72.2
Arginina	44.7	49.0	47.1
Lisina	25.7	26.2	28.0
Hidroxilisina	6.6	6.4	3.5
Histidina	4.3	5.8	5.8
Amonio	44.0	41.8	37.3
Nitrógeno	18.6	18.3	18.5

1.2.2 Reacciones de precipitación de las proteínas

La purificación de las enzimas, usualmente inicia con la precipitación de estas de una solución. La estabilidad de las proteínas en la solución dependerá principalmente de la carga y la hidratación. Los grupos polares de las proteínas (grupos $-NH_2$, $COOH$, OH) tienden a ser atraídos por moléculas de

agua que los rodean y producen una cáscara de hidratación. Cualquier factor que neutralice la carga o remueva el agua de hidratación provocará la precipitación de las proteínas. Existen diversos procesos para realizar una precipitación:

- **Salificación:** cuando una sal neutra, como el sulfato de amonio o de sodio, se añade a la solución de las proteínas la cáscara de hidratación es removida y la proteína se precipita. Como regla general, a mayor peso molecular de proteína se requiere menor cantidad de sal.
 - **Precipitación isoelectrica:** las proteínas son menos solubles en su punto isoelectrico. Algunas proteínas se precipitan inmediatamente cuando llegan a este pH.
 - **Precipitación por solventes orgánicos.** Cuando un solvente orgánico se añade a la solución de las proteínas, las moléculas de agua disponibles son reducidas y ocurre la precipitación. Los solventes orgánicos reducen la constante dieléctrica del medio. Por lo tanto, los alcoholes son poderosos agentes precipitantes de las proteínas.
 - **Precipitación por iones de metales pesados.** En un medio alcalino, las proteínas tiene cargas netas negativas, por lo tanto, si se añaden sales o metales pesados a una solución, los iones metálicos cargados positivamente forman complejos con las moléculas de las proteínas.
- [13]

1.2.3 Colágeno como biomaterial

En la década pasada, el colágeno ha sido uno de los biomateriales más utilizados en aplicaciones biomédicas debido a sus excelentes características biológicas y sus propiedades fisicoquímicas. El colágeno puede ser modificado fácilmente por reacción de sus grupos funcionales, generando entrecruzamientos de moléculas biológicas para crear una gran variedad de materiales con propiedades biológicas o mecánicas adaptables. [14]

El colágeno ha sido utilizado en diversas aplicaciones como lo son: suturas, agentes hemostáticos, para remplazo y regeneración de tejido (hueso, cartílago, piel, vasos sanguíneos, tráquea, esófago, etc.), cirugía cosmética (labios, piel), compositos dentales, plantillas para regeneración de piel, membranas oxigenadoras, anticonceptivos (métodos de barrera), matrices biodegradables, envolturas protectoras de nervios, implantes, vendaje corneal, lentes de contacto, liberación de fármacos etc... [15, 16, 14]

Los polímeros naturales deben ser modificados y esterilizados antes de su uso clínico. Todos los métodos de estabilización y esterilización pueden alterar moderada o severamente la velocidad de degradación *in vivo* y cambiar las propiedades mecánicas y físicas de los polímeros naturales. [17]

El colágeno tipo I es un material adecuado para la implantación, ya que solo una pequeña cantidad de personas poseen inmunidad humoral en contra de ella y una simple prueba serológica puede verificar si un paciente es susceptible a una reacción alérgica en respuesta a un biomaterial a base de colágeno. [18]

1.2.4. Gelatina

La gelatina es un biopolímero natural obtenida por desnaturalización físico-química ó térmica del colágeno [19] no se encuentra en la naturaleza pero se deriva del colágeno por adición hidrolítica. Tiene alto grado de grupos funcionales biológicos, está compuesta principalmente por hélices al azar desnaturalizadas con cierta cantidad de hélices de colágeno regular. Es una mezcla heterogénea de proteínas solubles en agua de alto peso molecular, formadas por la unión de un número variado de aminoácidos.

Tabla 4: Contenido aproximado de aminoácidos en la grenetina, comparado con el colágeno tipo I [12]

Aminoácidos	% (Grenetina)	%(Colágeno)
Glicina	25.5	31.9
Alanina	8.7	11.35
Valina	2.5	2.36
Leucina	3.2	2.55
Isoleucina	1.4	1.33
Metionina	1.0	0.53
Fenil alanina	2.5	1.39
Prolina	18	12.3
Hidroxiprolina	14.1	10.0
Serina	0.4	3.50
Treonina	1.9	1.80
Tirosina	0.5	0.45
Ácido aspártico	6.6	4.70
Ácido glutámico	11.4	7.20
Arginina	8.1	4.71
Lisina	4.1	2.80
Sistina y cisteína	0.1	0.35
Histidina	0.8	0.58

El contenido aproximado de aminoácidos de la grenetina se presenta en la Tabla 4 (el total es más del 100% ya que el agua está incorporada en las moléculas de los aminoácidos individuales). Además, en esta misma tabla, se hace la comparación de éstos datos con los presentados para el colágeno tipo I y se observa que la cantidad de aminoácidos no difiere de manera significativa.

En estado sólido es vítrea, quebradiza de color ligeramente amarillo. La gelatina contiene 8 -13% de humedad y tiene una densidad relativa de 1.3-1.4. Cuando los gránulos de gelatina se remojan en agua fría se hidratan en

partículas discretas. Al ser calentado el sistema, estas partículas hinchadas se disuelven para formar una solución. Este método de preparación de soluciones de gelatina se prefiere especialmente cuando se desean altas concentraciones. El comportamiento de las soluciones de gretina está influenciado por la temperatura, pH, contenido de ceniza, método de fabricación, la historia térmica y concentración. [20]

1.2.4.1 Proceso obtención gretina [21]

El principal constituyente de la gretina es proteína, entre 85 y 92%, seguido de sales minerales y un poco de humedad remanente. Es producida por la hidrolisis parcial de colágeno nativo. Como ya se mencionó, el colágeno está constituido por largas cadenas de aminoácidos. Cuando el colágeno es obtenido de animales jóvenes es soluble en agua caliente, no obstante pierde esta propiedad con el paso del tiempo. Esto se debe a la estructura frágil del colágeno se vuelve más estable formando entrecruzamientos.

En la manufactura de la gretina, la materia prima animal es tratada con ácidos ó álcalis resultando en una ruptura parcial de los entrecruzamientos de la molécula del colágeno, la estructura se desglosa hasta colágeno soluble en agua caliente. Esta hidrólisis química puede ser complementada o incluso remplazada por el uso de enzimas como la colagenasa.

Este tipo de desnaturalización e hidrolisis química ó bioquímica es conocida como "el proceso de acondicionamiento" dentro de la industria de la gelatina. En este proceso, el efecto de los ácidos ó álcali así como la energía térmica crean diferentes tipos de fragmentos de colágeno. Además el alto peso molecular de los oligómeros de las sub unidades alfa pueden permanecer intactos ó parcialmente hidrolizados. Esto da a lugar a una mezcla de diferentes tamaños de cadenas y por lo tanto, pesos moleculares.

El material óseo se corta en piezas de 0.5 cm aproximadamente y se someten a un proceso de desengrasado en agua caliente con agitación mecánica durante 30 min. Este proceso elimina los restos de carne que se hubieran quedado adheridos. Posteriormente se secan con aire caliente. Las astillas óseas se someten a tratamiento con ácido clorhídrico diluido, el cual solubiliza el ácido clorhídrico y el carbonato de calcio para separarlos por precipitación. Este proceso de desmineralización es conocido como maceración. Al término de la maceración, todo lo que queda es el marco proteínico estructural del hueso, la materia prima real u "oseína" que se utiliza para la producción de grenetina.

A continuación, la oseína se lleva a un proceso de purificación y desionización, para eliminar las sales minerales disueltas las cuales ejercen influencia en las propiedades físicas de la gelatina, las cuales disminuyen con el incremento de las sales. [21]

Finalmente, se muelen los granos de hasta obtener un tamaño de partícula adecuado y es empacado para su comercialización. Debe almacenarse en condiciones adecuadas, ya que son fácilmente hidratadas por la humedad del ambiente.

Para la obtención de la gelatina es necesario hidratar la grenetina con agua caliente y esperar a que la solución solidifique o "cuaje".

1.3 Fase inorgánica

La fase mineral está compuesta principalmente de cristales microscópicos de fosfatos de calcio, dentro de los cuales la Hidroxiapatita (HAp), es la más importante. Otras fases minerales presentes en el hueso son el fosfato dicálcico ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), el fosfato de calcio dibásico (DCP, CaHPO_4), el fosfato tricálcico (TCP; $\text{Ca}_3(\text{PO})_2$) y algunas fases amorfas de fosfatos de calcio. Existen además otros iones como el citrato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{4-}$) el carbonato (CO_3^{2-}),

fluoruro (F^-) y también iones hidroxilo (OH^-), los cuales pueden dar lugar a sutiles diferencias microestructurales en el tejido óseo. Finalmente, también se encuentran algunas impurezas tales como magnesio y sodio, con trazas de cloro y hierro. [11]

La HAp, cuya fórmula química es $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, tiene una composición, en peso, teórica de 39.68% Ca, 18.45% P, una relación en peso Ca/P de 2.151 y una relación molar de 1.667. Ligeros desequilibrios en la relación Ca/P dan lugar a la aparición de otras fases. Si la relación Ca/P es menor que 1.67, el fosfato tricálcico alfa o beta puede estar presente. Si, por el contrario, la relación es mayor de 1.67, óxido de calcio puede aparecer. Estas fases extras pueden afectar la respuesta biológica de un implante. [22]

Tabla 5 Comparación entre esmalte, dentina, hueso e hidroxiapatita sintética. [11]

Elemento (% en peso)	Esmalte dental	Dentina	Hueso	Hidroxiapatita sintética
Calcio	36.1	35.0	35.5	39.0
Fósforo	17.3	17.1	17.1	18.5
Dióxido de carbono	3.0	4.0	4.4	-
Magnesio	0.5	1.2	0.9	-
Sodio	0.2	0.2	1.1	-
Potasio	0.1	0.07	0.1	-
Cloro	0.3	0.03	0.1	-
Flúor	0.016	0.017	0.02	-
Azufre	0.1	0.2	0.6	-
Zinc	0.016	0.018	-	-
Silicio	0.003	-	0.04	-
Relación Atómica Ca/P	1.62	1.59	1.71	1.667
Índice de cristalinidad	70-75	33-37	33-37	80-100

En la Tabla 5 se muestra una comparación de la composición de hidroxiapatita biológica y sintética, donde podemos apreciar además las diferencias en cristalinidad.

La HAp y el fosfato de calcio dibásico son las únicas fases de fosfato de calcio que son químicamente estables a la temperatura y pH del cuerpo humano 37°C y alrededor de 7, respectivamente [11].

1.3.1 Estructura del tejido óseo

El hueso no es completamente sólido, tiene pequeños espacios entre sus células y los componentes de la matriz osteoide. Algunos espacios constituyen conductos para los vasos sanguíneos que suministran nutrientes a las células óseas. Otros espacios sirven como lugares de almacenamiento de la médula ósea roja. Según el tamaño y distribución de los espacios, las regiones de un hueso pueden clasificarse como esponjosas o compactas. Aproximadamente el 80% del volumen del esqueleto está formado por hueso compacto y el 20% por hueso esponjoso.

Tejido óseo compacto: contiene pocos espacios y es el componente más sólido del tejido óseo. Se encuentra por debajo del periostio de todos los huesos y forma la mayor parte de la diáfisis (tallo) de los huesos largos. Proporciona protección, soporte y ofrece resistencia a la tensión causada por el peso y el movimiento.

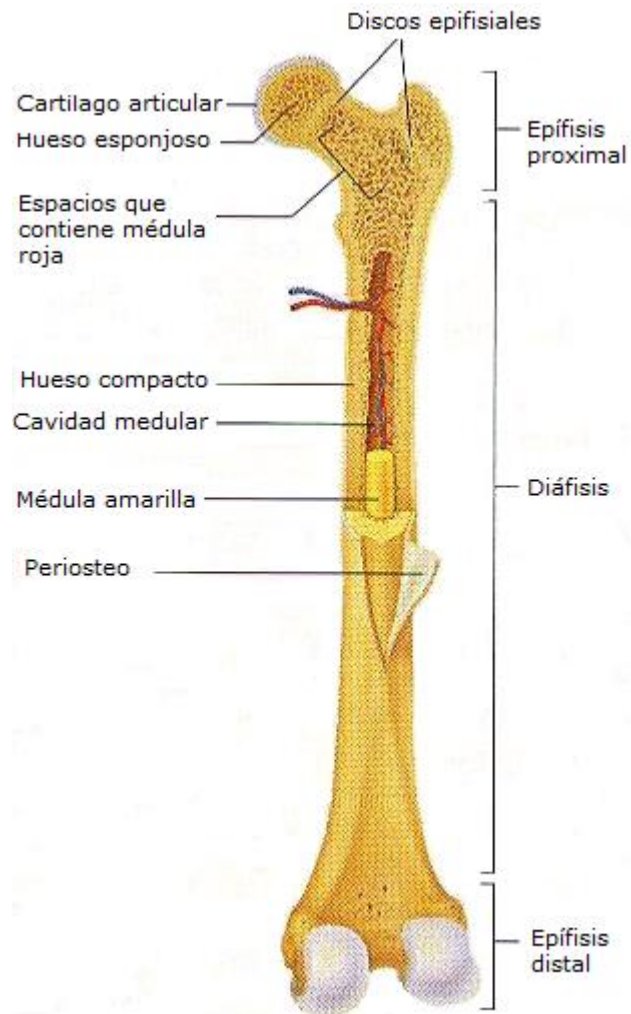


Figura 3: Conformación del hueso [23]

Hueso esponjoso: tiene láminas dispuestas en una red irregular de columnas delgadas que se denominan trabéculas. Los espacios macroscópicos entre las trabéculas hacen más livianos a los huesos y pueden a veces llenarse con médula ósea roja. Constituye la mayor parte del tejido, tanto de los huesos largos, cortos, planos e irregulares. El tejido esponjoso difiere del compacto en dos aspectos: el tejido esponjoso es liviano, lo cual reduce el peso total del hueso, así se facilita su movimiento cuando es traccionado por un músculo esquelético. En segundo lugar, las trabéculas del hueso compacto ofrecen soporte y protección a la médula ósea. La médula ósea roja se acumula en el tejido óseo esponjoso de los huesos de las caderas, costillas, esternón,

vértebras y epífisis de los huesos largos. Allí es donde se produce la hemopoyesis (producción de células sanguíneas) en los adultos. [5]

1.3.2 Propiedades mecánicas

El esqueleto tiene múltiples funciones, mecánicamente el hueso cumple dos roles importantes, proteger órganos vitales de sufrir algún trauma y como soporte para la contracción de los músculos. Sus propiedades mecánicas están determinadas principalmente por la cantidad, el arreglo y la estructura molecular de sus dos constituyentes principales, el colágeno y la hidroxiapatita. [24]

El colágeno y otras moléculas orgánicas proporcionan la resistencia a la tensión del hueso, mientras que la hidroxiapatita es la responsable de la resistencia a la compresión. Las cantidades relativas de estos dos componentes varían en diferentes etapas de la vida. Los factores que influyen en el comportamiento mecánico general del hueso incluyen la fracción volumétrica de los constituyentes, las propiedades mecánicas, la orientación y las interacciones interfaciales de los enlaces. Los enlaces interfaciales entre los constituyentes orgánicos y minerales están basados, en parte, en interacciones electrostáticas entre los dominios orgánicos con carga negativa y la superficie mineral con carga positiva. [25]

En la Tabla 6 se puede notar la diferencia entre grupos de muestras de hueso cortical y esponjoso. El esfuerzo a la compresión es un parámetro crucial para la descripción de las diferentes propiedades del hueso tomadas de diferentes sitios.

En la mayoría de los casos, estos datos son útiles como el límite mínimo en el cálculo de las propiedades mecánicas de las piezas que son utilizadas como prótesis óseas, específicamente aquellas con funciones de soporte de peso [26]

Tabla 6: Propiedades físicas y mecánicas de muestras óseas tomadas de fémur de bovinos. Dimensiones de las muestras 5x5x5 mm [26]

Propiedades físicas y mecánicas	Hueso cortical	Hueso cortical esponjoso	Hueso esponjoso
Resistencia a la compresión (N/mm ²) a una velocidad de deformación de 1 mm/min	171.67 ± 17.53	15.10 ± 12.16	5.62 ± 2.37
Peso específico de hueso húmedo (mg/mm ³) (después de sacar las muestras de una solución de Ringer durante 2 hr)	1.94 ± 0.05	1.25 ± 0.14	1.07 ± 0.08
Peso específico de hueso seco (mg/mm ³) (después de centrifugado, tratamiento de las muestras con ester y secado a 100°C durante 16 hr)	1.65 ± 0.05	0.67 ± 0.19	0.40 ± 0.08
Peso específico de los polvos (mg/mm ³) (después de incinerarlos en una mufla a 1000°C por 16 hr)	1.12 ± 0.04	0.41 ± 0.12	0.25 ± 0.05
Contenido específico de calcio (mg/mm ³) (después de disolver los polvos en una solución al 20% y posterior a la determinación de calcio por medio de un método complexiometrico basado en titrisol	0.44 ± 0.01	0.14 ± 0.04	0.09 ± 0.03

1.4 Biomateriales

Se define como biomaterial a un material o sustancia diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo [27]. Pueden clasificarse en dos grandes grupos según su procedencia: artificiales o biomédicos y naturales ó biológicos. En cuanto a los de origen natural, se incluyen las proteínas, como colágeno o elastina, y polisacáridos como la quitina. Dentro de los compuestos artificiales se encuentran los metales, las cerámicas, los polímeros y los materiales compuestos, formados por más de un componente incorporado a una matriz metálica, cerámica u orgánica.

Entre los *biomateriales metálicos* pueden citarse el acero inoxidable, aleaciones metálicas de Co-Cr y Ti y metales como la plata (Ag), oro (Au) o platino (Pt). En realidad, muy pocos de los metales existentes se emplean como biomateriales porque deben cumplir la condición de ser tolerados por el huésped y ser resistentes a la corrosión, puesto que el cuerpo humano es un medio hostil por su composición electrolítica y su temperatura.

Los *biomateriales poliméricos* se caracterizan por su gran variedad. Su origen puede ser natural o sintético y además pueden ser bioestables y biodegradables. Todo ello hace que tengan numerosas aplicaciones en el campo biomédico.

En cuanto a los *biomateriales cerámicos*, en este grupo se incluyen: óxido de aluminio (Al_2O_3), óxido de circonio (ZrO_2), óxido de titanio (TiO_2), sulfato de calcio (CaSO_4), fosfato cálcico (CaPO_4), vidrios y vidrios cerámicos ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-X}$; $\text{X}=\text{Na}_2\text{O}$, MgO , TiO_2 , CaF_2). Pueden ser inertes como Al_2O_3 , ZrO_2 y TiO_2 ; o bien bioactivas, en el sentido de que permiten una respuesta biológica

específica en su interfase, permitiendo la formación de enlaces entre el tejido y el propio material. Estos biomateriales se emplean en prótesis ortopédicas, implantes dentales, cirugía maxilofacial o como cementos óseos para relleno de huesos. [28]

Las cerámicas se clasifican según su microestructura en vítrea, policristalinas y cristalinas y según su comportamiento en el organismo en *inertes o bioinertes* (tienen una influencia nula o muy pequeña en los tejidos vivos que los rodean: alúmina y zirconia) y *reactivas o bioactivas* (pueden enlazarse a los tejidos óseos vivos: hidroxiapatita, fosfato tricálcico y biovidrios). [29]

De acuerdo al tipo de biocerámicas usadas y su interacción con el tejido se pueden clasificar en bioinertes y bioactivas. Las biocerámicas bioactivas pueden ser reabsorbibles o no reabsorbibles. El término bioinerte puede ser definido como un mínimo nivel de respuesta del tejido huésped el cual se cubre de una delgada capa fibrosa la cual es no adherente. [22]

1.4.1 Proceso de fabricación

Existen diversos métodos para la fabricación de cerámicas porosas, entre ellas se encuentra el método gelcasting el cual es uno de los procesos más comunes para obtener piezas altamente porosas. Esto se lleva a cabo por la polimerización de monómeros orgánicos (gelación) en el cual las piezas son consolidadas a través de una reacción de polimerización. Un cuerpo verde se forma después de que la solución es vaciada en un molde. La Figura 4 muestra un diagrama de flujo general de este método. Los dos factores críticos en este proceso son: 1) la velocidad de gelación, que debe ser lo suficientemente rápida para evitar el colapso de las piezas, 2) la reología del gel que se forma es importante al momento de vaciar. [2]

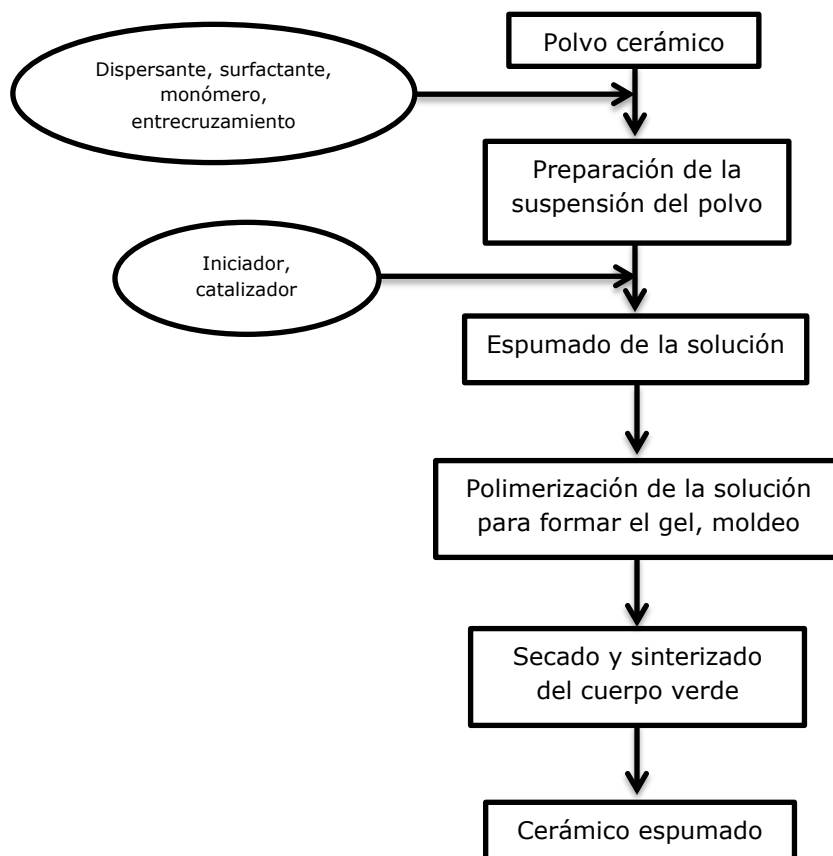


Figura 4: Esquema general del método gelcasting para producir piezas cerámicas.

El proceso gelcasting modificado (PGCM) usa una solución de polímeros para formar un fuerte gel reticulado que proporciona un mecanismo para inmovilizar permanentemente la mezcla cerámica en la forma deseada, después de que se vacía en un molde.

Se requieren obtener polvos de tamaño uniforme, el solvente debe ser capaz de disolver los polímeros que se van a utilizar pero sin reaccionar con los polvos cerámicos. La característica principal del solvente es que debe de ser capaz de mojar los polvos completamente, sin reaccionar con ellos, pero que pueda disolver los productos orgánicos que se agreguen posteriormente. También es importante que se evaporen sin hervir a temperaturas relativamente bajas. El etanol es una buena opción en el caso que nos interesa ya que cumple con estas características.

También debe de utilizarse un dispersante, para prevenir la aglomeración de los productos sólidos, y mantener este estado durante el proceso, disminuyendo la viscosidad de la suspensión.

Los aglutinantes, confieren resistencia mecánica a las piezas, para que puedan ser removidas, almacenadas y trabajadas sin romperse. Estos compuestos son polímeros de alto peso molecular que se disuelven completamente en el solvente, aumentando la viscosidad del mismo. Conforme el solvente se evapora, se adhieren a la superficie de las partículas y luego se forma un sistema entrecruzado que le da la resistencia mecánica necesaria a las piezas. El aglutinante más utilizado es el polivinil butiral (PVB). La temperatura de transición vítrea de este polímero es de alrededor de 49°C, por lo que utilizado solo produce piezas duras y quebradizas a temperatura ambiente. Es por esto que se agrega otro compuesto polimérico, el plastificante, que se entrelaza en las cadenas del aglutinante, expandiéndolo estructuralmente y disminuyendo su temperatura de transición vítrea. Además, este fenómeno hace que la distribución del aglutinante sea más uniforme en la suspensión. [12]

Antecedentes.

Biocerámicas basadas en fosfatos de calcio han sido utilizadas en aplicaciones clínicas por más de 20 años. Se ha encontrado que las fases estables de los cerámicos de calcio se asocian con la temperatura de procesamiento, la presencia de agua y el ambiente biológico. Solo dos fases de fosfatos de calcio son estables cuando están en contacto con un medio acuoso, como los fluidos a temperatura corporal. Las fases estables son $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (brushita) a $\text{pH} < 4.2$, mientras que $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (hidroxiapatita) es otra fase estable a $\text{pH} > 4.2$. Otras fases como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (TCP) y $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ (TTCP) pueden aparecer a altas temperaturas. Cuando están en contacto con agua o fluidos corporales a 37°C , las fases de fosfatos de calcio no hidratados pueden reaccionar para formar hidroxiapatita. [30]

La hidroxiapatita está compuesta esencialmente por fósforo y calcio, con una relación calcio-fósforo de 1.67 [29]; es el principal componente inorgánico del hueso de los vertebrados y está presente en dientes y huesos, confiriéndoles su dureza característica. Pertenece a la familia de las apatitas, presentando una estructura hexagonal que pertenece al grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$. La HAP natural, además de calcio y fósforo, contiene porcentajes mínimos de sodio, cloro, carbonatos y magnesio, los cuales juegan un papel preponderante en la función remodeladora del hueso. [31]. Este fosfato de calcio, que se puede obtener de forma sintética, presenta características de biocompatibilidad, no toxicidad, estabilidad química, osteoconducción y bioactividad; tales propiedades hacen al material muy práctico para usos médicos. [32]

Las cerámicas densas de hidroxiapatita tienen una resistencia a la compresión mayor que el hueso cortical, pero su resistencia a la tracción es 2.5 veces menor que la resistencia a la compresión, esto se debe a que los átomos se

encuentran escasamente agrupados. La resistencia a la fatiga también es baja, lo cual es común en las cerámicas sintetizadas.

Por todo esto, la hidroxiapatita por sí sola no es muy adecuada para implantes que requieran soportar carga, sin embargo resulta muy útil para implantes de baja tensión, como en el oído medio, o como injerto óseo, para rellenar defectos metafisarios en fracturas de meseta tibial. [29]

Para que la hidroxiapatita funcione correctamente como biomaterial, debe ser lo suficientemente porosa para permitir la penetración celular, crecimiento de tejido interno, incursión vascular rápida y suministro de nutrientes [2], así como cumplir con las siguientes propiedades:

- a) Debe ser biocompatible, lo cual permite el crecimiento celular, su adhesión a la superficie y proliferación.
- b) El material debe inducir la unión de huesos fuertes, lo que resulta en osteoconducción y osteoinducción.
- c) La velocidad de formación de nuevo tejido y biodegradación deben coincidir entre sí.
- d) La resistencia mecánica del implante debe ser la adecuada para proporcionar el soporte adecuado antes de la regeneración.
- e) La estructura porosa, con tamaño de poro mayor a 100 μm , permite penetración celular, crecimiento de tejido y vascularización (Tabla 7). [33]

La colonización celular de los sustitutos de huesos depende de la porosidad del material, en particular del tamaño y la distribución de los poros y de las interconexiones entre los macroporos. Estas interconexiones deben formar una

especie de sistema de túneles permitiendo el paso y la renovación de fluidos biológicos y la entrada de células óseas. [34]

Se han realizado diversos trabajos sobre la síntesis de hidroxiapatita por diversos métodos para sustituir diferentes partes de tejido óseo. Entre los estudios más destacados se encuentran:

Un método convencional para sintetizar hidroxiapatita es la precipitación en un medio acuoso inicial de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como materia prima. La síntesis de Hap pura por este método requiere de control de muchos parámetros como el pH de reacción, tiempo de madurez, temperatura y estequiometría de la materia prima. Una pequeña variación de estos parámetros puede generar variaciones drásticas en la composición del producto final. Es posible obtener hidroxiapatita altamente pura con porosidades diferentes pero controladas variando la temperatura de sinterización y/o introduciendo grafito o PMMA como agente generador de poros, eliminándolos en el proceso de sinterizado sin dejar residuos. [34]

S.K. Swain y colaboradores han utilizado esponjas de grado comercial, con porosidad promedio de 30 poros/pulg, como base para preparar HAp, sumergiendo la esponja en una solución de hidroxiapatita con un aglomerado de Polivinil Butiral (PVA), obteniendo una matriz con poros interconectados con un diámetro promedio de 200 μm [35].

Cerámicas porosas con diferentes morfologías porosas y distribución de tamaños pueden ser fabricadas por diferentes procesos como: quemar una esponja polimérica impregnada de una solución cerámica, sinterización en estado sólido, proceso sol-gel, replicación de espumas poliméricas por impregnación y el proceso gelcasting. [36]

Tabla 7: Distribución del tamaño de poro de un soporte ideal para aplicaciones ingenieriles de tejido óseo. [33]

Tamaño de poro (μm)	Función biológica
<1	Interacción de proteínas, responsable de la bioactividad.
1-20	Adhesión celular, orientación del crecimiento celular (direccionalmente).
100-1000	Crecimiento celular y crecimiento interno del hueso.
>1000	Forma y funcionalidad del implante

Una forma de obtener HAp con porosidad controlada es fabricando esferitas de HAp, a partir de cuentas de PMMA, para formar un molde de CaCO_3 con tamaño de poro homogéneo que puede ser rellenado con HAp. [37]

Jacqueline M. Cordell et al [38] prepararon una suspensión coloidal de HAp y la mezclaron con microesferas de PMMA, para utilizarlas como formadores de poros, en la misma relación volumétrica. Sometieron las piezas a tratamiento térmico para eliminar la fase orgánica y sinterizar las partículas cerámicas. De esta forma obtuvieron piezas con porosidad entre 4 y 10 μm de diámetro.

Una modificación del método gelcasting para producir esferas de hidroxiapatita porosa ha sido propuesta por E. Rivera-Muñoz et al [39], obteniendo un tamaño de poro relativamente homogéneo menor de 10 μm de diámetro. Las muestras obtenidas por este método se mezclaron con una solución de grenetina, en diferentes concentraciones [40], produciendo un material compuesto con propiedades mecánicas favorables para sustituir áreas específicas de tejido óseo [41].

El método gelcasting ha sido utilizado debido a las ventajas que presenta sobre otros procesos, en términos de precisión dimensional y capacidad de formar estructuras complejas, la estructura uniforme y de alta resistencia de los cuerpos en verde, así como la simplicidad y reducción de costos de producción.

Como ejemplo, S. Padilla et al analizaron las propiedades mecánicas, en modo de flexión y penetración, de piezas de HAp obtenidas por el método gelcasting, así como la influencia del contenido de sólidos en la mezcla, reportando valores de flexión entre 40 y 60 MPa y dureza Vickers de 250 Kp/mm² [42]

Objetivos.

El presente trabajo tiene como principales objetivos:

- 1.- Controlar el tamaño de los poros de objetos de hidroxiapatita, obtenidos mediante el proceso gelcasting modificado, utilizando esferitas de polimetilmetacrilato (PMMA) de diferentes diámetros y concentraciones.
- 2.- Caracterizar el material obtenido mediante las técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM), Espectroscopía de energía dispersiva (EDS), Difracción de rayos - X (XRD), Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y Espectroscopía Raman.
- 3.- Evaluar las propiedades mecánicas mediante pruebas de esfuerzo en modo de compresión.

Hipótesis.

Mediante el método gelcasting es posible moldear objetos de HAp con casi cualquier forma deseada, sin embargo, hasta el momento sólo se ha podido controlar la microporosidad de las piezas finales. Con la inclusión y dispersión de microesferas de PMMA, durante la etapa de polimerización, será posible que los polvos de HAp adquieran la forma de las microesferas, y una vez eliminadas éstas, mediante un tratamiento térmico, dejarán tras de sí los espacios necesarios que constituyan poros macroscópicos. Además, con el uso de esferas de PMMA de diferentes tamaños, será posible controlar eficientemente los tamaños de los poros, según la aplicación deseada. Por último, la incorporación de una fase orgánica, a fin de formar un material compuesto orgánico-inorgánico, incrementará las propiedades mecánicas de las piezas obtenidas.

Justificación.

Durante el proceso de fabricación de cualquier material es importante controlar todos aquellos parámetros que puedan afectar sus propiedades finales, como lo son la composición, temperatura, forma, tamaño de partícula, densidad, tiempos de los diferentes tratamientos, entre otros.

El control del tamaño y distribución de la porosidad, en la síntesis de un material compuesto a base de hidroxiapatita, es fundamental para su aplicación en implantes médicos. Al obtener piezas de HAp, cuyo tamaño de poro sea homogéneo, se mejorarán las propiedades físicas, químicas y mecánicas de este biocerámico.

Desde una perspectiva biológica, es una estrategia natural combinar polímeros y cerámicos para fabricar soportes para la ingeniería de tejidos óseos debido a que el hueso nativo es la combinación de un biopolímero e hidroxiapatita biológica ocurrida naturalmente. Desde el punto de vista de la ciencia de los materiales un solo tipo de material no siempre provee las propiedades mecánicas y químicas deseadas para una aplicación en particular [17]

CAPÍTULO II

Desarrollo experimental.

Se preparó un material compuesto base Hidroxiapatita reforzado con dos fases orgánicas diferentes: grenetina y colágeno. Las muestras se prepararon por el método gelcasting modificado [40]. En la Figura 5 se presenta un esquema general del proceso Gel Casting Modificado.

Este método tiene la ventaja de tener una formación rápida del gel y los moldes pueden ser hechos de diversos materiales (metal, vidrio, madera, silicón, etc.); además, pueden producirse piezas de tamaño, forma y porosidad controlada, lo cual se refleja en una reducción de costos de producción. [39] Un aspecto importante es el hecho de que prácticamente todo el proceso, salvo el primer y último pasos, se realiza a temperatura ambiente, lo cual no genera gastos de energía significativos, como en otros procesos de obtención de biocerámicas.

Capítulo II: Desarrollo Experimental

Con el PGCM se pueden obtener piezas de diversas morfologías vaciando en moldes una mezcla de HAp y polímeros, los cuales forman una red de macromoléculas poliméricas, las cuales proporciona un mecanismo para mantener unidas las partículas cerámicas [43].

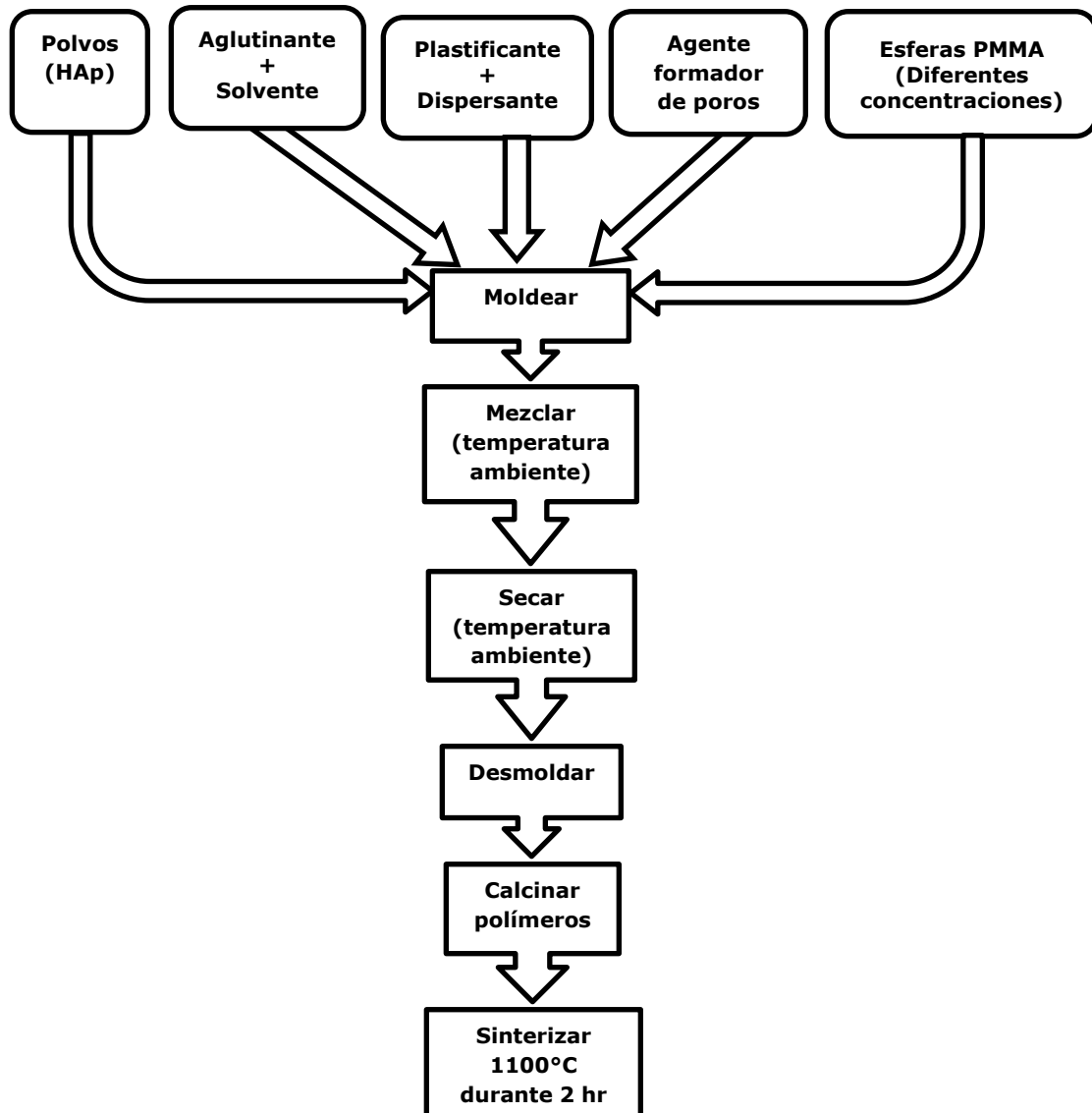


Figura 5: Esquema general del proceso Gel Casting Modificado

Para realizar este proceso, es necesario tener polvos de HAp de tamaño uniforme, el solvente debe ser capaz de disolver los polímeros que se van a utilizar, pero sin reaccionar con los polvos cerámicos, así como evaporarse a temperaturas relativamente bajas. También debe utilizarse un dispersante, para prevenir la aglomeración de los productos sólidos, y mantener este estado estable durante todo el proceso, disminuyendo la viscosidad de la suspensión.

Como se mencionó anteriormente, los aglutinantes confieren resistencia mecánica a las piezas, para que puedan ser removidas, almacenados y trabajadas sin romperse. Conforme el solvente se evapora, se adhieren a la superficie de las partículas, se forma un sistema entrecruzado que le da resistencia mecánica necesaria a las piezas.

2.1 Materiales y métodos

Los reactivos y cantidades, utilizadas en el PGCM, han sido estudiados en trabajos previos [44, 39, 45]. En este trabajo se realizó una modificación al PGCM; se adicionó otro agente formador de poros con el objetivo de incrementar el tamaño y concentración de los intersticios y analizar los cambios que sufren las propiedades mecánicas con el incremento de la porosidad.

En la Tabla 8 se presentan los reactivos utilizados, su función en el PGCM, su peso molecular y la cantidad (peso ó volumen) necesaria para moldear la fase mineral del material compuesto.

Tabla 8: Reactivos utilizados en el proceso gelcasting modificado. Todos ellos con grado reactivo.

Reactivos	Cantidad	Función en el PGCM
Etanol (EtOH) [MERK]	30 ml	Solvente
Polivinil butiral (PVB) [ACROS] PM 36 000	1.325 gr	Aglutinante
Polietilen glicol (PEG) [FLUKA] PM 6 000	1.14 gr	Plastificante
Ácido poliacrílico (APA) [FLUKA]	0.2 gr = 1 ml	Dispersante
Hidroxiapatita (HAp) [ALDRICH]	15 gr	Polvos de cerámica
Ácido oxálico (Ac. Ox.) [FLUKA]	0.6 gr	Agente formador de microporos
Microesferas de polimetil metacrilato (PMMA)	Cantidad variable	Agente formador de macroporos

2.2 Preparación de las muestras cerámicas

1. Se mide el solvente y se deposita en un vaso de precipitados, agregando la cantidad necesaria de PVB; se pone en agitación magnética hasta obtener una solución homogénea.
2. El PEG se pesa y se funde en una parrilla de calentamiento; posteriormente se le añade el APA.
3. Una vez mezclados el PEG y el APA, se incorpora la solución del paso 1.
4. Se mezcla la HAp con el Ac. Ox. Esta mezcla se añade lentamente a las microesferas de polimetil metacrilato en la cantidad correspondiente.
5. Por último, la solución del paso 3 se vierte a la mezcla de los polvos (paso 4) para obtener la pasta cerámica.

2.3 Moldeado

1. Se preparan moldes de silicón con diferentes geometrías

2. Se rellenan los moldes con la pasta cerámica utilizando una espátula. Se debe asegurar que la mezcla rellene los moldes totalmente; para lograrlo, debe comprimirse la pasta con la ayuda de la espátula, un par de veces.
3. Se dejan secar las muestras en el molde a temperatura ambiente hasta que se evapore el EtOH. Durante este tiempo se lleva a cabo el fraguado y la formación de los microporos.
4. Una vez fraguadas se desmoldan las piezas, se guardan en cajas Petri y se etiquetan según corresponda.

2.3 Calcinación del polímero y sinterizado.

1. Se colocan las muestras en crisoles de alúmina.
2. Se introduce el crisol en la mufla la cual se programa para realizar un incremento de temperatura a razón de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, de manera que se da el tiempo y la temperatura suficiente para eliminar todos los polímeros y llevar a cabo el sinterizado de las partículas cerámicas de HAp.
3. Se mantienen las muestras en la mufla durante 30 hr aproximadamente. Utilizando 18.33 hr para llegar a una temperatura de 1100°C , permaneciendo a esta temperatura durante 2 hr para lograr la sinterización de las partículas de HAp, y por último se dejan enfriar hasta temperatura ambiente. El esquema del tratamiento térmico se observa en la Figura 6.

Observaciones

Las condiciones del tratamiento térmico fueron modificadas de trabajos previos [39, 40, 41] para evitar la fractura de las piezas durante la calcinación de las microesferas de PMMA ocasionada por el tamaño y concentración de las mismas.

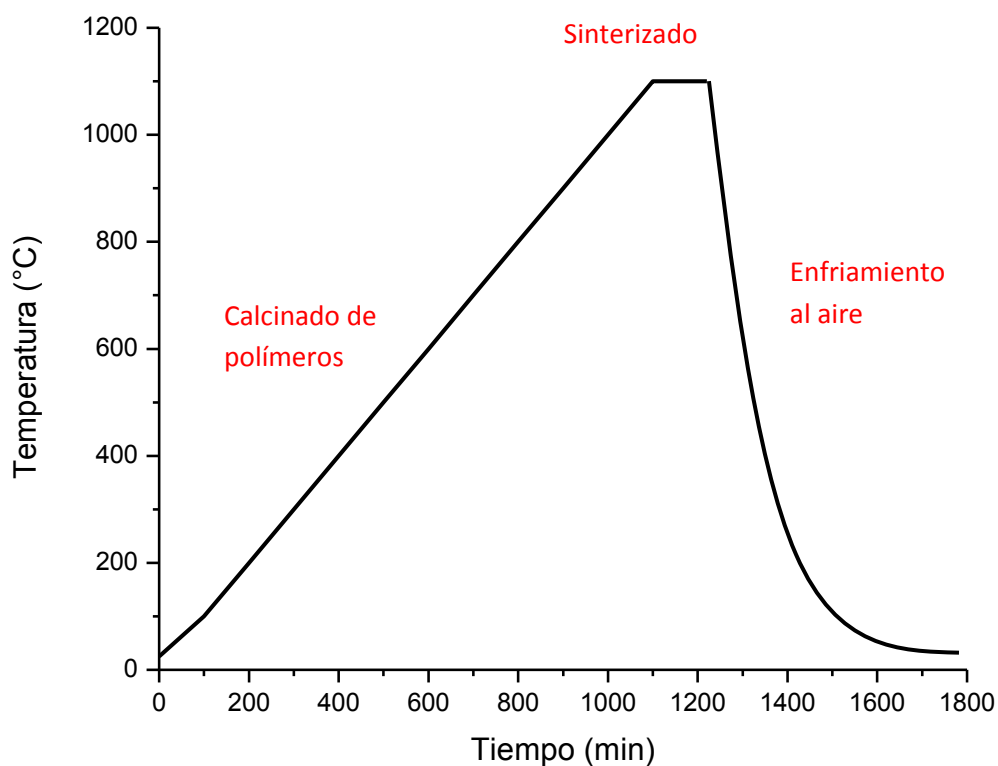


Figura 6: Gráfica del tratamiento térmico realizado a las piezas de HAp

2.4 Preparación de la fase orgánica

Se compararon dos fases orgánicas diferentes: grenetina comercial y colágeno extraído de cola de res.

Grenetina

Comercialmente, para la preparación de una solución de grenetina se recomienda disolver 1.4 gr en 100 ml de agua a una temperatura de entre 80 y 100°C. En la literatura se ha reportado el uso de diferentes concentraciones

de dicha solución para el refuerzo de matrices cerámicas [40, 41]. En el presente trabajo se consideran 5 concentraciones diferentes de fase orgánica con el objetivo de analizar la influencia, tanto de su concentración como de la porosidad, en las propiedades mecánicas del material compuesto.

La concentración se obtuvo como porcentaje en peso de la grenetina o colágeno disuelto en agua, de la siguiente forma:

$$\% FO = \left(\frac{W_{fo}}{W_s} \right) (100) \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde W_{fo} es la cantidad en peso de fase orgánica hidratada, añadida a las piezas de hidroxiapatita poroso por el método de goteo. Este registro se obtiene al pesar las muestras antes, durante y después de la adición de dicha fase, así como posterior al secado de las muestras. W_s es el peso de las muestras cerámicas después del PGCM, es decir, únicamente el material cerámico (Figura 5).

Considerando estos cálculos, se trabajó con los siguientes porcentajes en peso de fase orgánica (Tabla 9).

Un esquema general del proceso de obtención del material compuesto, puede apreciarse en la Figura 7, utilizando las piezas cerámicas obtenidas por el Proceso Gel Casting Modificado descrito en la Figura 5.

Tabla 9: Porcentaje en peso de fase orgánica (grenetina o colágeno) añadida a las piezas cerámicas.

% Fase orgánica	Tipo de fase orgánica	
6.303 ± 0.27	Grenetina	
8.02 ± 0.27	Grenetina	Colágeno
10.89 ± 0.27	Grenetina	Colágeno
14.91 ± 0.27	Grenetina	
19.5 ± 0.27	Grenetina	Colágeno

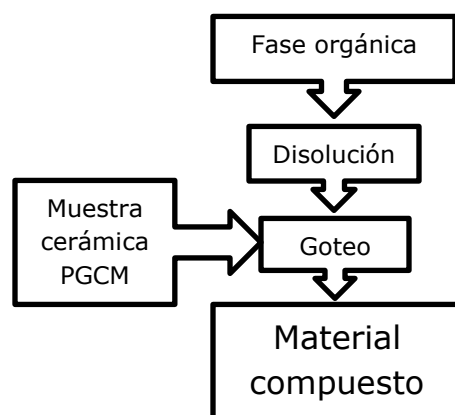


Figura 7: Esquema general para la obtención del material compuesto.

Para la preparación de la grenetina y la incorporación de ésta a las piezas de HAp, se realiza el siguiente procedimiento:

1. Pesar la cantidad correspondiente de grenetina.
2. Calentar, a 80°C, 50 ml de agua en un vaso de precipitados.
3. Hidratar la grenetina paulatinamente hasta obtener una solución homogénea.
4. Agregar por el método de goteo, la solución de grenetina a las muestras de HAp obtenidas mediante el PGCM.
5. Dejar secar a temperatura ambiente.

Colágeno

Para la extracción, purificación y adición del colágeno, se utilizó una cola de res (1.5 kg aprox.) sin piel y cortada en trozos, siguiendo el procedimiento que a continuación se describe:

2.4.1 Extracción

1. Se separa la mayor cantidad posible de carne del cartílago.
2. Se sumerge el cartílago en acetona industrial durante 24 hr.
3. Se lava con agua de la llave por triplicado.
4. Se enjuaga con agua destilada.
5. Se pone a cocer el cartílago en una olla exprés con 3 lt de agua durante aproximadamente 6 hr, revisando la cantidad de agua a intervalos de 1.5 hr. Se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se mete al congelador para que el caldo gelifique.
6. Se retira la capa superior de grasa formada.
7. Se cuela el gel formado para retirar todos los sólidos presentes.

2.4.2 Remoción de grasa

La eliminación total de la grasa se realiza por extracción con disolventes orgánicos, mediante el siguiente procedimiento:

1. Se elimina la mayor cantidad de solvente por evaporación.
2. En un embudo de separación, se coloca una solución de colágeno y hexano, en partes iguales, y se realiza la separación de fases. El embudo debe agitarse moderadamente y purgarlo con frecuencia, para evitar la presión en su interior.

3. Se realiza el procedimiento anterior cuatro veces, utilizando en cada ocasión disolvente limpio para extraer la mayor cantidad de grasa.
4. La solución obtenida se deja ventilar durante 12 hr para eliminar el solvente residual.
5. Por último, se tapa el recipiente y se introduce en un congelador.

2.4.3 Purificación

La multiplicidad de grupos ácidos y básicos de una proteína hace que su solubilidad dependa de las concentraciones de sales disueltas, la polaridad del solvente, el pH y la temperatura. Las solubilidades de distintas proteínas varían en gran medida en un conjunto dado de condiciones. Algunas proteínas precipitan en condiciones en que otras aún están bastante solubles. Este efecto suele utilizarse como base para la purificación proteica.

Los solventes miscibles en agua, como acetona y etanol, suelen ser buenos precipitantes de las proteínas porque sus bajas constantes dieléctricas reducen el poder de solvatación de sus soluciones acuosas hacia los iones disueltos, como las proteínas [46].

La purificación de la solución de colágeno, obtenida previamente, se llevó a cabo de la siguiente forma:

1. Se agrega a la solución de colágeno 10 ml de etanol para formar un precipitado.
2. Se extrae el precipitado y se le vuelve a agregar alcohol. Este procedimiento se realiza dos veces más, hasta obtener una masa uniforme.
3. El colágeno obtenido se debe mantener en congelación hasta su utilización.

Capítulo II: Desarrollo Experimental

4. Para utilizar el colágeno se calientan 50 ml de agua, a 50 °C, y se pone en agitación magnética la cantidad de colágeno necesaria hasta que se disuelva; este proceso dura 10 min aproximadamente. En este caso, se utilizaron las mismas cantidades que las de grenetina, de acuerdo a los datos de la Tabla 9.
5. Para adicionar la fase orgánica se utilizó también el método de goteo.

CAPÍTULO III

Técnicas de caracterización

3.2 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

La espectroscopia infrarroja es el estudio de la interacción de la luz infrarroja con la materia. Se fundamenta en la absorción de dicha radiación por las moléculas provocando vibración en sus enlaces. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se provoque una transición vibracional en alguno de los enlaces de la molécula.

Cada átomo que constituye una molécula está desplazándose permanentemente, uno con respecto al otro, sobre una distancia promedio llamada longitud de enlace, es decir, las distancias interatómicas oscilan continuamente alrededor de un valor que le es propio, manteniéndose, en el

estado basal de energía a temperatura ambiente, a una distancia promedio llamada longitud de enlace. Cada enlace, dentro de una molécula, está vibrando a una frecuencia determinada que le es característica, y puede efectuar un movimiento de estiramiento a lo largo del eje del enlace, Figura 8, o un movimiento de deformación, en donde uno de los átomos del enlace M1-m2 se aparta del eje del enlace, Figura 9.

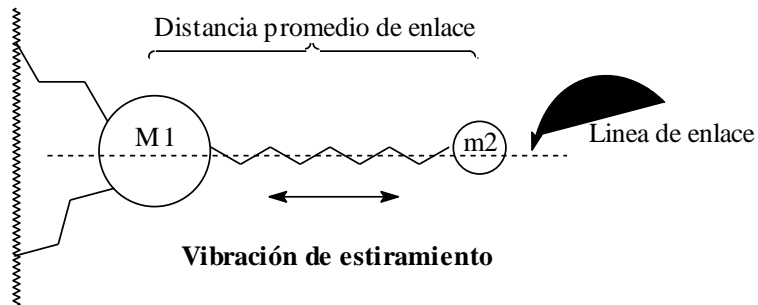


Figura 8: Estiramiento en el eje del enlace.

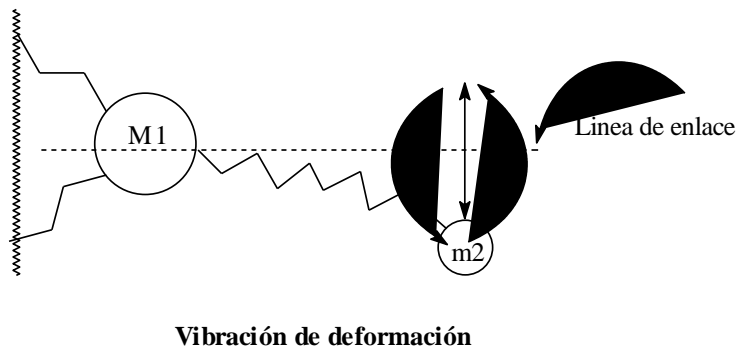


Figura 9: Deformación fuera del eje del enlace.

Una molécula biatómica como la de la Figura 10, solo poseerá un modo de vibración que será el de estiramiento a lo largo del enlace. La deformación no existe ya que correspondería a una rotación antes que a una vibración.

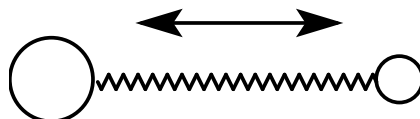


Figura 10: Estiramiento de molécula diatómica.

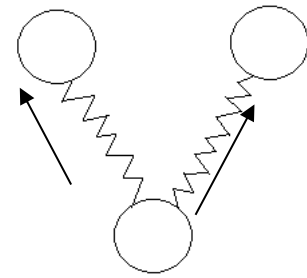
Si la molécula tiene más de dos átomos, los posibles modos de vibración aumentan de manera considerable, como se puede observar en la Figura 11, llegando a $(3n-5)$, los modos en moléculas lineales.

Para moléculas no lineales más complejas, se esperan $(3n-6)$ modos vibracionales, donde n es el número de átomos que forman la estructura.

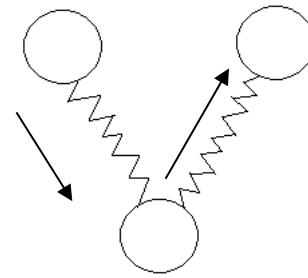
Las vibraciones moleculares son en realidad, el resultado de la contribución de todos los átomos que la componen. Sin embargo, con el propósito de simplificar los cálculos, es posible analizar algunas vibraciones moleculares como si en ellas interviniesen solo unos pocos átomos. Cuando hay más de dos átomos involucrados en una molécula, pueden encontrarse distintos modos de vibración, algunos simétricos y otros asimétricos como se muestra en la Figura 11.

Las frecuencias de oscilación simétricas son de menor energía que las asimétricas. Si sobre uno de estos enlaces, que tiene una frecuencia de vibración característica, se hace incidir radiación infrarroja de la misma frecuencia. Este enlace absorberá esa radiación y se traducirá en un aumento en la distancia de enlace, haciendo que ambos átomos se alejen más de lo normal, es decir, vibran a una distancia promedio mayor a la distancia de enlace, lo que se traduce en que el enlace ha pasado entonces a otro estado de alta energía que está cuantizado, que se llama estado excitado, como puede verse en la Figura 12. [47]

VIBRACIONES DE TENSIÓN

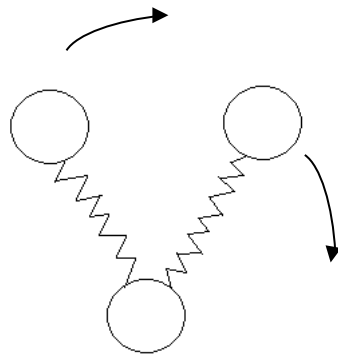


Simétrica

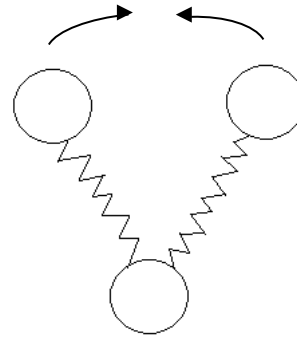


Asimétrica

VIBRACIONES DE FLEXIÓN

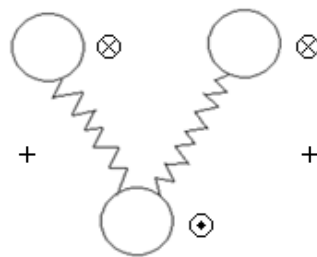


Balanceo en el plano

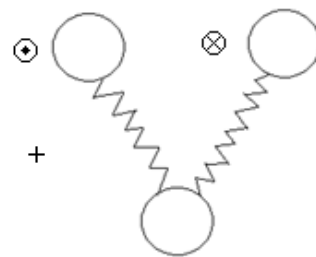


Tijereteo en el plano

VIBRACIONES DE TENSIÓN



Aleteo fuera del plano



Torsión fuera del plano

Figura 11: Distintos modos de vibración.

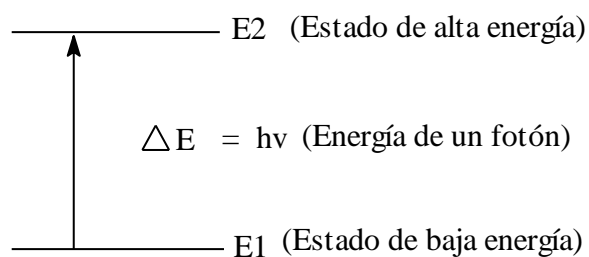


Figura 12: El estado excitado E2 es el estado al que llega un enlace que ha absorbido un fotón de radiación electromagnética de igual frecuencia o energía al del enlace en cuestión. E1 representa la energía de la frecuencia de vibración normal del enlace.

Es una condición importante que el enlace esté formado por átomos de diferente electronegatividad para que tanto el centro de carga positivo como el centro de carga negativo del enlace no coincidan. De esa manera, este enlace tendrá momento dipolar. Así, la variación del momento dipolar definido como el producto de la variación de la distancia r entre las cargas del dipolo que lo forman y su carga q , al ser excitado, hace que el fenómeno de intercambio de energía sea posible entre este y la radiación electromagnética. Cuanto mayor sea el cambio en el momento dipolar del enlace provocado por la excitación, mayor será la intensidad de la absorción.

Como resultado de un análisis infrarrojo se obtiene un gráfico de intensidad contra números de onda como el que se muestra en la Figura 13 donde las bandas que aparecen están asociadas a los grupos funcionales presentes de la muestra que se analiza. Apoyándose de patrones espectrales existentes, es posible establecer los tipos de enlaces presentes en una muestra.

La amplitud de las bandas está determinada por las interacciones químicas del segmento de la molécula o grupo funcional que presenta vibraciones en determinada longitud de onda, cuando hay varias interacciones químicas el

pico resultante es amplio. Si hay pocas interacciones químicas, el pico será agudo. La intensidad del pico está directamente relacionada con la concentración a mayor concentración, más intenso es el pico.

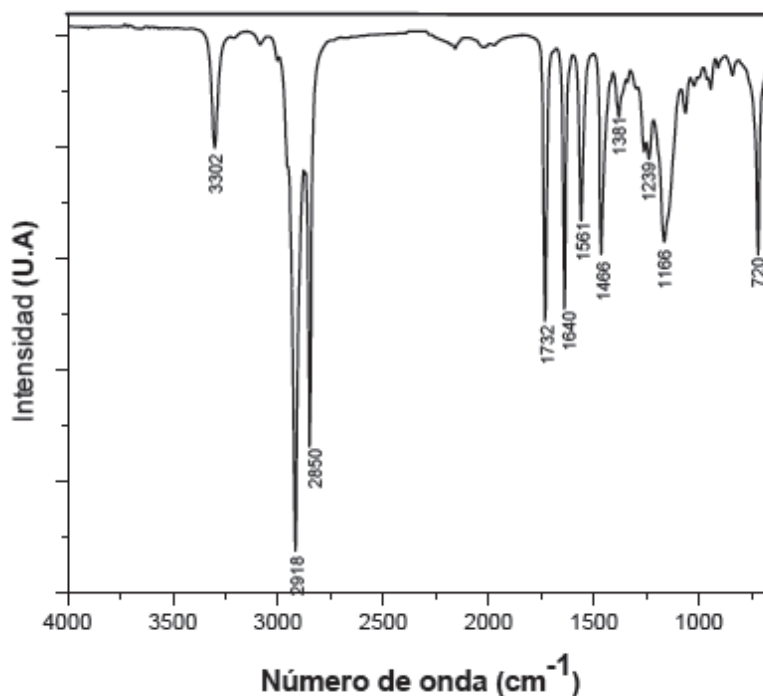


Figura 13: Ejemplo de un espectro resultado de un análisis de infrarrojo.

3.2.1 Preparación y análisis de muestras.

Una de las técnicas más populares de manipulación de las muestras sólidas, es la formación de pastillas de KBr (también se utilizan otros haluros de metales alcalinos). Las sales de haluros tienen la propiedad de fluencia en frío, por lo cual, cuando se presiona suficientemente este material finamente pulverizado, presenta propiedades transparentes o translúcidas como el vidrio. Al usar esta técnica, se mezclan a fondo la muestra (alrededor de 1 mg) finamente pulverizada, con aproximadamente 100 mg de polvo de bromuro de potasio desecado. La mezcla se puede realizar con ayuda de un mortero y su pistilo. Posteriormente se presiona la mezcla en un troquel con una presión de

entre 700 y 1000 kg/cm² hasta obtener un disco transparente. A continuación, el disco se coloca en la trayectoria del instrumento para su examen espectroscópico. Siendo iónico, el KBr transmite a lo largo de la mayor parte de la región del infrarrojo hasta una frecuencia de aproximadamente 400 cm⁻¹. El yoduro de cesio absorbe por debajo de 200 cm⁻¹ y a veces se utiliza por su mayor transparencia a bajas frecuencias.

3.3 Microscopía electrónica de barrido. [48]

El microscopio electrónico de barrido (MEB) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. A partir de la interacción de un haz de electrones con la muestra, se producen distintos tipos de señal que se generan desde ésta y se utilizan para examinar muchas de sus características. Con este instrumento se pueden realizar estudios de los aspectos morfológicos de zonas microscópicas de los distintos materiales. Las principales características del MEB son la resolución ($\sim 100 \text{ \AA}$), la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras.

En el microscopio electrónico de barrido se hace incidir un delgado haz de electrones acelerados, con energías desde unos cientos de eV hasta unas decenas de keV, sobre una muestra gruesa, opaca a los electrones. Este haz se focaliza sobre la superficie de la muestra de forma que realiza un barrido de la misma siguiendo una trayectoria de líneas paralelas.

Para obtener una imagen, la superficie de la muestra sólida se barre mediante un rastreo programado (raster pattern) con un haz de electrones

Capítulo III: Técnicas de caracterización

muy fino focalizado o con una sonda adecuada. El haz de electrones barre la superficie en línea recta (dirección x), vuelve a la posición inicial y es desplazado hacia abajo (dirección y) un incremento establecido. Este proceso se repite hasta que el área deseada de la superficie ha sido cubierta. Durante este proceso de barrido se recibe una señal por encima de la superficie (dirección z) y se almacena en un sistema computarizado donde posteriormente se convierte en una imagen.

En un microscopio electrónico de barrido el haz de electrones de energía elevada interacciona con la muestra y como consecuencia de ello se producen en la superficie diversos tipos de señales. Estas señales incluyen electrones retrodispersos, secundarios y Auger, fotones debidos a la fluorescencia de rayos X y otros fotones de diversas energías. El microscopio electrónico de barrido se utiliza principalmente para estudiar la superficie o la estructura cercana a la superficie de muestras más gruesas.

Un microscopio electrónico de barrido con sus componentes principales consta de un haz de electrones, que pasa a través de lentes condensadoras y objetivas, y es barrido a lo largo de la muestra por las bobinas de barrido, mientras que un detector cuenta el número de electrones secundarios de baja energía emitidos por cada punto de la superficie (Figura 14). Al mismo tiempo se utiliza el foco de un tubo de rayos catódicos para proporcionar contraste a la imagen. Tanto el haz de electrones que proviene del detector como el foco son barridos de forma similar a la de un receptor de televisión dando lugar a la imagen ampliada

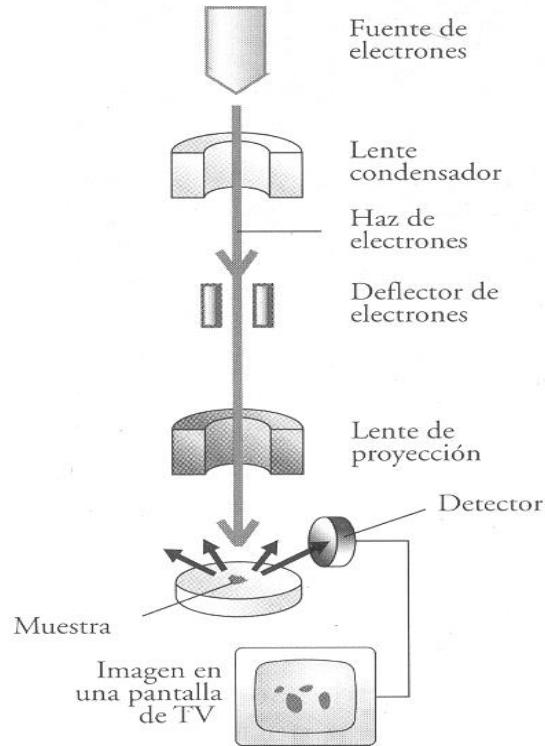


Figura 14: Esquema general de un microscopio electrónico de barrido (SEM)

El voltaje de aceleración de un microscopio electrónico de barrido puede encontrarse entre 2 y 40 keV.

En cuanto a la interacción de los electrones con la materia, debido a que las muestras presentan un cierto espesor, la energía del haz incidente se disipa dando lugar a emisiones secundarias con pérdidas de energía. En el MEB se puede, en principio, utilizar para formar una imagen cualquier tipo de emisión secundaria que se pueda medir. La señal más utilizada es la que proviene de los electrones secundarios, mientras que de las otras radiaciones, los rayos X se utilizan para el análisis elemental, y las restantes (catodoluminiscencia, electrones retrodispersados, electrones transmitidos, etc.) tienen aplicaciones muy especializadas.

Capítulo III: Técnicas de caracterización

De todas las formas de radiación resultantes de la interacción del haz incidente y la muestra (Figura 15), hay dos realmente fundamentales: los *electrones secundarios* y los *electrones retrodispersados*. Los primeros son electrones de baja energía (decenas de eV) que resultan de la emisión por parte de los átomos constituyentes de la muestra (los más cercanos a la superficie) debido a la colisión con el haz incidente. Los electrones retrodispersados sin embargo, son electrones del haz incidente que han interactuado (colisionado) con los átomos de la muestra y han sido reflejados. La intensidad de ambas emisiones varía en función del ángulo que forma el haz incidente con la superficie del material, es decir depende de la topografía de la muestra.

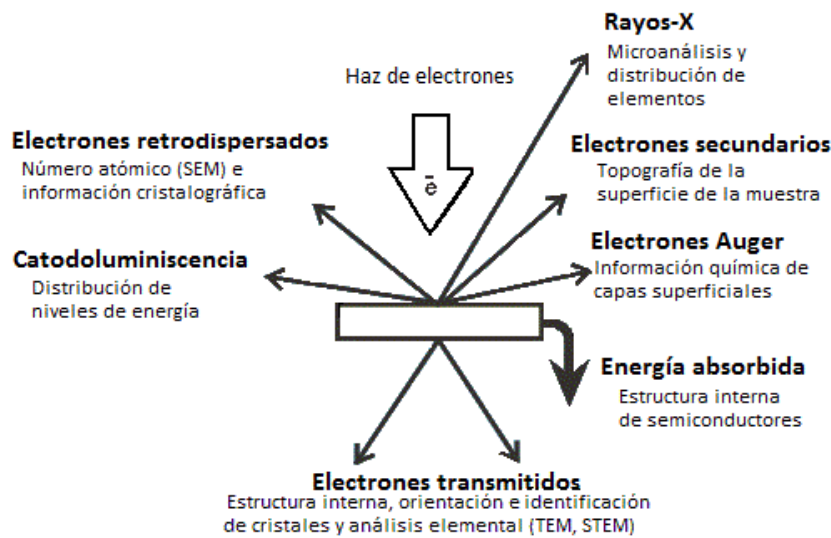


Figura 15: Diferentes formas de radiación en el SEM.

La señal emitida por los electrones y radiación resultantes del impacto se recoge mediante un detector y se amplifica para cada posición de la sonda. Las variaciones en la intensidad de la señal que se producen conforme la sonda barre la superficie de la muestra, se utilizan para variar la intensidad de la señal en un tubo de rayos catódicos que se desplaza en sincronía con la sonda. De esta forma existe una relación directa entre la posición del haz de

electrones y la fluorescencia producida en el tubo de rayos catódicos. El resultado es una imagen topográfica muy ampliada de la muestra.

Si la muestra no es buen conductor eléctrico se acostumbra a recubrirla con una película conductora metálica o de carbono para evitar que ésta se cargue cuando sea irradiada.

3.3.1 Preparación y análisis de las muestras

Para la observación de las muestras en el microscopio electrónico de barrido es necesario fijarlas en un portamuestras cilíndrico metálico (Cobre, latón aluminio, etc.), previamente pulido y limpio, utilizando cinta de carbón. Las muestras pueden ser recubiertas con una fina capa de Au. Para fines del presente trabajo, las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6060L a 20 Kv y fueron recubiertas con oro en un equipo Sputter Coater EMS 550.

3.4 Espectroscopía de dispersión de energía (EDS) [49]

La detección de rayos X emitidos por la muestra permite realizar análisis elemental de la misma. Estos análisis pueden demostrar la distribución de un determinado elemento o de varios tipos de átomos diferentes en la muestra de estudio, o si existe o no en una zona del espécimen cierto elemento, y aún estimar cuantitativamente la abundancia de un elemento.

Algunos de los choques de electrones del haz con los electrones de la muestra producen que estos últimos sean expulsados del átomo (choques inelásticos).

Capítulo III: Técnicas de caracterización

Como en el estado energético del que partió el electrón queda con un lugar vacío, un electrón de un estado de mayor energía ocupa el lugar vacante, desprendiendo un fotón con la energía sobrante. Esta energía se desprende en forma fotones de rayos X. La energía emitida, y por lo tanto la longitud de onda de los rayos x, dependerán del estado en el cual se desprendió el electrón expulsado y del estado en el que se originó el que lo viene a reemplazar, lo cual es característico para cada átomo. De esta manera se puede identificar el elemento en que se produjo la transición electrónica midiendo la energía irradiada. La resolución de la determinación es siempre más baja que la proporcionada por la emisión secundaria o la retrodispersión de electrones, debido al que el volumen de la muestra en el que se originan los rayos x es mucho mayor que el que da lugar a los electrones detectables. Cuanto menor sea el diámetro del área de la superficie de la muestra iluminada por el haz electrónico, menor será el voltaje de emisión y mayor la resolución.

En general, los análisis de rayos x se realizan después de haber registrado una imagen de la zona de la muestra que se desea estudiar. Esta imagen permite adaptar, dentro de ciertos límites, el diámetro de haz a circunscribir al tamaño de la estructura que se desea analizar. De esta forma los rayos x portarán la información de átomos situados en el volumen emisor de la zona iluminada y se podrá realizar una buena correlación entre estructura y composición elemental.

La cuantificación de la abundancia de un elemento presenta algunos problemas, pues mediciones en diferentes regiones de especímenes tridimensionales, dependen mucho de la topografía de la superficie del objeto, de manera que serían comparables únicamente las medidas realizadas sobre superficies con similares ángulos con respecto al haz y con respecto al detector.

3.4.1 Preparación y análisis de muestras

Las muestras para ser analizadas por espectroscopía de energía dispersiva deben ser pulverizadas y adheridas a un portamuestras metálico, previamente pulido y limpio, utilizando cinta de carbón para fijarla. Para fines del presente trabajo, los análisis se realizaron en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6060L con un voltaje de 20 Kv a 500X con un equipo de Espectroscopía de Emisión de Energía Oxford Inca X-Sight con un detector tipo WAFER de Si dopado con litio

3.5 Difracción de rayos x [50]

Mediante la técnica de difracción de rayos X (XRD) es posible estudiar la estructura cristalina de los materiales, es decir la manera en que los átomos y las moléculas se ordenan. Las diferentes configuraciones atómicas dan lugar a diversas fases o estructuras cristalinas.

En esta técnica se hace incidir un haz monocromático de rayos X sobre la muestra y con un detector se registra la intensidad del haz dispersado con respecto a la orientación del haz incidente, la cual varía como consecuencia del acomodo de los átomos de la muestra. Cuando los átomos o moléculas están ordenados ocurre el fenómeno de difracción el cual se explica brevemente a continuación.

En general, la interacción de la radiación electromagnética con la materia da a lugar a la dispersión, es decir, la remisión de radiación. Hay dos tipos de dispersión, elástica e inelástica. En la dispersión elástica no hay pérdida de

Capítulo III: Técnicas de caracterización

energía entre el haz incidente y el haz dispersado, el cual mantiene la misma longitud de onda y su cambio de fase corresponde a $\lambda/2$. Cuando el haz incide sobre la muestra, los electrones de los átomos comienzan a oscilar, es decir, continuamente se aceleran y desaceleran durante su movimiento y por lo tanto emiten una onda electromagnética. En un primer caso, la dispersión de los haces de rayos X es elástica, es decir, que no hay pérdida de energía durante la interacción.

El fenómeno de difracción es debido a la relación entre las fases de todas las ondas reflejadas por cada celda unidad del cristal, las diferencias de camino óptico entre los rayos que han atravesado distintos puntos del cristal, que a su vez producen un cambio en la amplitud de la onda resultante. Cuando las ondas están completamente desfasadas se anulan entre sí. Por el contrario, cuando las ondas están en fase, la amplitud de la onda final es la suma de las amplitudes para cada onda. Puesto que un cristal está compuesto de miles de celdas unidad, la interferencia constructiva entre todas ellas llega a resultar en un haz lo suficientemente intenso para ser medido con un detector de rayos X (Figura 16).

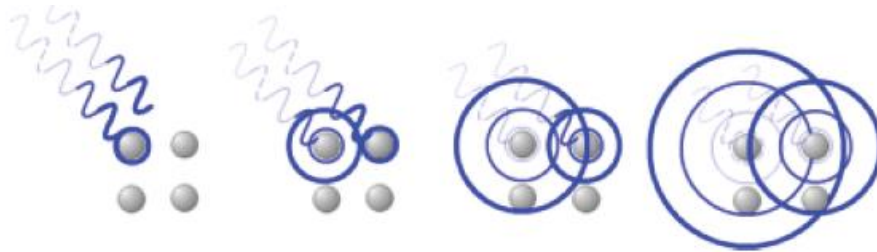


Figura 16: Ondas de rayos X dispersadas de manera ordenada por una estructura cristalina.

La condición para que las ondas monocromáticas estén en fase es que la diferencia de sus caminos ópticos sea cero o un múltiplo entero n de longitud de onda. En un cristal, la diferencia en el camino óptico entre átomos situados

Capítulo III: Técnicas de caracterización

en posiciones equivalentes en distintas celdas unidad es determinada por la ley de Bragg (Ecuación 2) esquematizada en la Figura 17.

$$2d_{hkl}\sin\theta = n\lambda \quad \text{Ec. 2)}$$

Donde d representa la distancia entre una familia de planos cristalinos, θ es el ángulo de difracción con respecto a la familia de planos y λ es la longitud de onda de los rayos X.

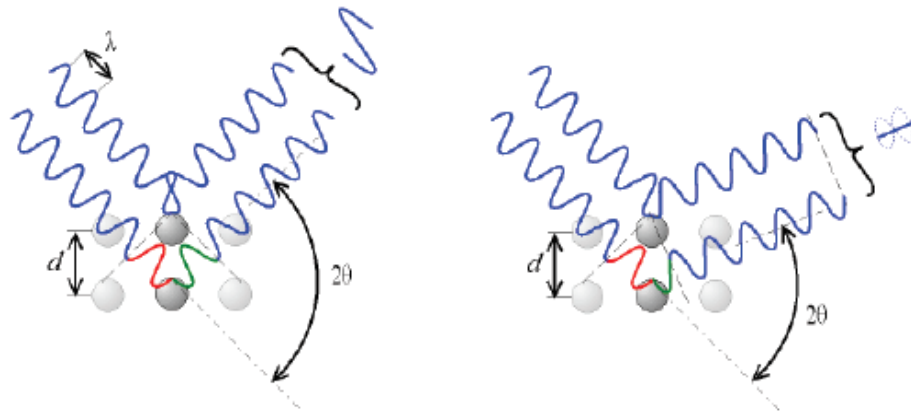


Figura 17: Esquemización de la Ley de Bragg.

Así pues, la técnica de rayos X consiste en ubicar aquellos puntos en el espacio donde se cumple la Ley de Bragg. Como resultado se obtiene un gráfico de la intensidad registrada por el detector en función del ángulo 2θ donde se ubican los picos que corresponden a las reflexiones de los planos cristalinos que cumplen con la ley de Bragg.

En un Difractómetro se registran los ángulos 2θ en los cuales se difracta el haz, dando un patrón característico de difracción. Si se conocen la longitud de onda de los rayos X, se pueden determinar los espaciamientos interplanares y, finalmente, la identidad de los planos que causan dicha difusión.

3.5.1 Preparación y análisis de las muestras

Para las mediciones de rayos X, las muestras fueron molidas en un mortero de ágata, el Difractómetro de rayos X Rigaku, modelo MiniFlex fué utilizado para determinar las posibles fases cristalinas de las muestras. Este equipo cuenta con un tubo de rayos X con blanco de Cu, con el cual se obtiene una radiación de longitud de onda con un valor de 1.54 \AA correspondiente a la radiación Cu ka.

3.6 Pruebas mecánicas

El comportamiento mecánico de un material refleja la relación entre la fuerza aplicada y la respuesta del material. Los factores que deben considerarse, para determinar las propiedades mecánicas, son la naturaleza de la carga aplicada, su duración y las condiciones del medio. La carga puede ser de tracción, compresión o cizalladura y su magnitud puede ser constante con el tiempo o fluctuar continuamente.

Si una carga es estática o bien cambia en una forma relativamente lenta con el tiempo y se aplica uniformemente sobre una sección o superficie de una pieza, el comportamiento mecánico se puede estimar mediante un simple ensayo de esfuerzo-deformación.

Las distintas cargas que actúan sobre los huesos se encuentran relacionadas con las diversas actividades del individuo, tanto compresivas como de tracción o de cizalladura. El hueso esponjoso trabaja principalmente a compresión, en cambio, el hueso cortical debe soportar fuerzas de compresión tracción y cizalladura. [51]

Los ensayos de compresión-deformación se realizan con fuerzas que operan en servicio de compresión y la probeta se contrae a lo largo de la dirección de la fuerza. El material es deformado hasta la ruptura, con una carga de compresión que aumenta gradualmente y que se aplica de forma uniaxial a lo largo del eje de la probeta.

Para calcular el esfuerzo de compresión se utiliza la relación:

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde F es la carga instantánea aplicada perpendicularmente a la sección de la probeta, en unidades de newtons (N) o libras (lb), y A_0 es el área (m^2 o in^2) de la sección original antes de aplicar la carga, por lo tanto, las unidades del esfuerzo a la compresión son lb/in^2 ó $N/m^2 = Pa$.

La Ecuación 4 se utiliza para calcular la deformación

$$\epsilon = \frac{l_i - l_0}{l_0} = \frac{\Delta l}{l_0} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde l_0 es la longitud original antes de aplicar la carga, l_i es la longitud instantánea y $l_i - l_0$ es el cambio de la longitud en un instante determinado con respecto a la longitud inicial producida por la deformación. [12]

3.6.1 Preparación y análisis de las muestras

Las piezas se someten a un proceso de desbaste para ajustarlas a las dimensiones reportadas en la literatura (Tabla 6), asegurándose de tener

Capítulo III: Técnicas de caracterización

caras paralelas. Antes de iniciar las pruebas, se deben registrar las dimensiones de las muestras para realizar los cálculos posteriores. Los ensayos fueron llevados a cabo en una máquina universal Zwick/Roell Z005 con una carga de 5 KN y una velocidad de 1mm/min.

CAPÍTULO IV

Resultados y discusión

Diferentes formas obtenidas de las piezas de material compuesto orgánico-inorgánico base HAp se presentan en la Figura 18. Se observa que la forma y longitud de éstas varía desde 3 mm hasta 1 cm aproximadamente. Las piezas se obtuvieron con estas dimensiones para comparar los resultados obtenidos, en las pruebas a modo de compresión, con los que están reportados en trabajos anteriores [41] así como en la literatura para muestras de hueso natural [26].



Figura 18: Muestras del material compuesto orgánico-inorgánico base hidroxiapatita obtenidas mediante el proceso Gelcasting modificado. La escala se presenta en cm.

Capítulo IV: Resultados y discusión

Para obtener los macroporos en las piezas cerámicas se utilizaron esferas de polimetil metacrilato, las cuales muestran en la Figura 19, obtenida por microscopia electrónica de barrido. En esta imagen se puede observar la forma esferoidal del polímero y una distribución de tamaños, obteniéndose un diámetro máximo de 40 μm .

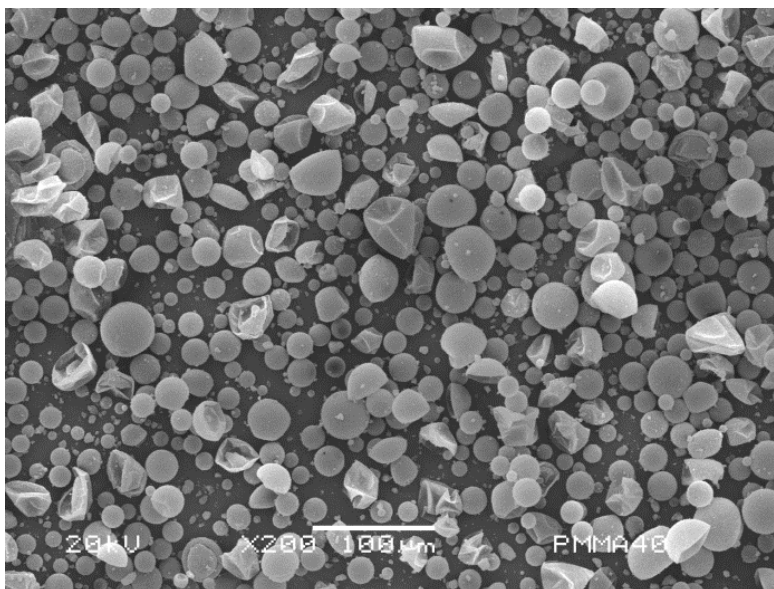


Figura 19: Micrografía a 100X de las esferas de polímero utilizadas para la formación de los poros en las piezas cerámicas.

Las diferentes cantidades de esferas de polimetil metacrilato utilizadas generan piezas con diferente porosidad. Las proporciones de polímero utilizadas van en relación volumétrica de acuerdo a la Tabla 10.

Tabla 10: Relación volumétrica de HAp:PMMA.

	HAp:PMMA (relación volumétrica)
HAp C	1:1
HAp D	1:1.5
HAp E	1:2
HAp F	1:2.5

4.1 Microscopia electrónica de barrido

Con microscopia electrónica de barrido se observa la morfología de la superficie de la muestra; de esta manera, es posible analizar la forma y distribución de la porosidad, así como la integración de la fase orgánica en la matriz inorgánica.

Una micrografía de las muestras de HAp con las microesferas de PMMA, se puede observar en la Figura 20; en esta imagen se puede apreciar la distribución del material polimérico dentro de la matriz cerámica.

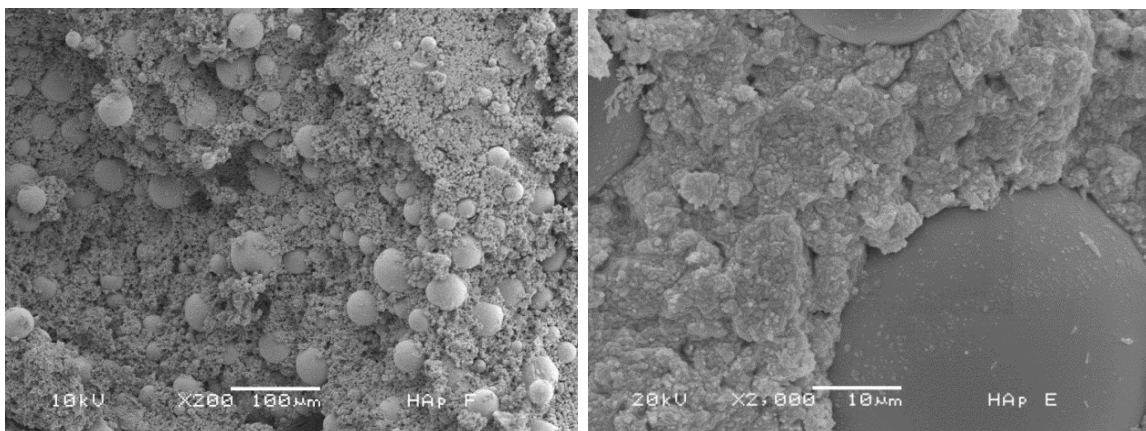


Figura 20: Micrografía SEM de una muestra de HAp obtenida por el PGCM antes del tratamiento térmico, a 200X y 10 KeV y a 2000X y 20 KeV.

Las micrografías anteriores presentan una distribución homogénea de las microesferas de PMMA y por lo tanto, se espera que la porosidad de las piezas cerámicas será uniforme en todo el material. A mayores ampliaciones es posible apreciar que únicamente existe una interacción física entre los polvos cerámicos y las esferas poliméricas, es decir, la superficie del polímero no es afectada por la mezcla polimérica utilizada en el proceso de fabricación de las

piezas ni viceversa y, de esta manera, corroboramos la permanencia de las propiedades de la hidroxiapatita procesada por el método gelcasting modificado a pesar de la adición de estos agentes formadores de macroporos.

Una vez obtenidas las piezas como se muestran en la Figura 20, se someten a un tratamiento térmico como el descrito en la Figura 5. En la micrografía de la Figura 21 se aprecian los poros formados tras la calcinación de los polímeros. Es posible distinguir la interconexión de éstos macroporos. La microporosidad obtenida también favorece la interconexión de estos poros, como se aprecia en la Figura 22. En esta misma imagen es posible determinar el tamaño promedio de los microporos, el cual se encuentra entre 1 y 5 μm .

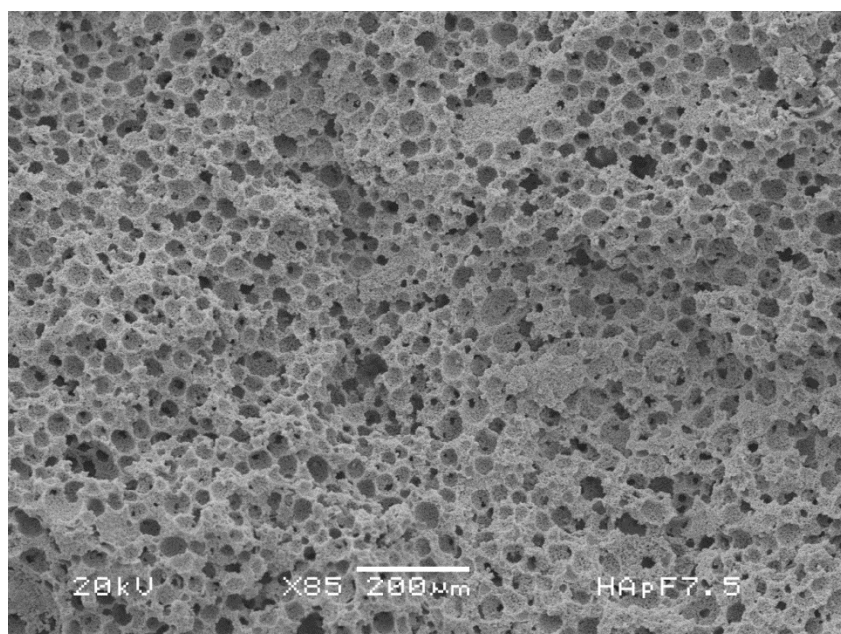


Figura 21: Micrografía SEM de las muestras porosas obtenidas por el PGCM después de tratamiento térmico a 85X y 20kv.

Tanto en la Figura 21 como en Figura 23 podemos apreciar el tamaño promedio de los macroporos generados por la calcinación de las microesferas

Capítulo IV: Resultados y discusión

de PMMA, el cual se encuentra entre 20 y 40 μm , tal como era de esperarse debido a los diámetros de las microesferas utilizadas

Comparando estos resultados con los tamaños promedios de poros reportados en la literatura (Tabla 7), podemos afirmar que las piezas cerámicas, obtenidas por el proceso gelcasting modificado, favorecerán la adhesión celular, y el crecimiento celular orientado. Así mismo, se ha reportado que estas dimensiones de porosidad son responsables de la interacción de proteínas y la bioactividad.

Cabe hacer notar que se logró una distribución muy homogénea de micro y macro poros, lo cual resalta la importancia del proceso de moldeo y, a su vez, contribuirá de forma positiva en el desempeño del material dentro del organismo huésped, obteniendo, hasta este punto, un material con características estructurales semejantes a las del tejido óseo natural.

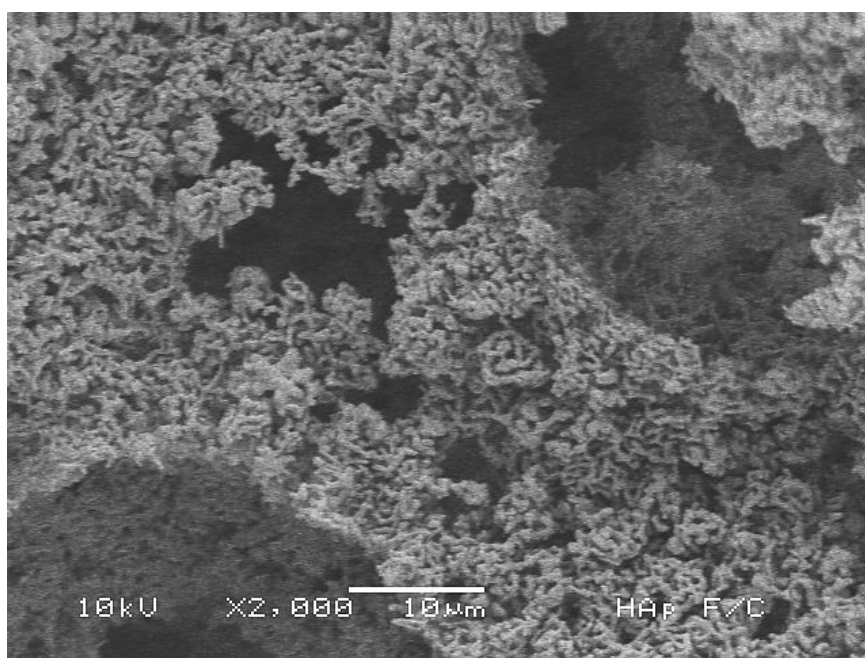


Figura 22: Micrografía SEM a 2000X de piezas cerámicas de HAP con micro y macro porosidad interconectada.

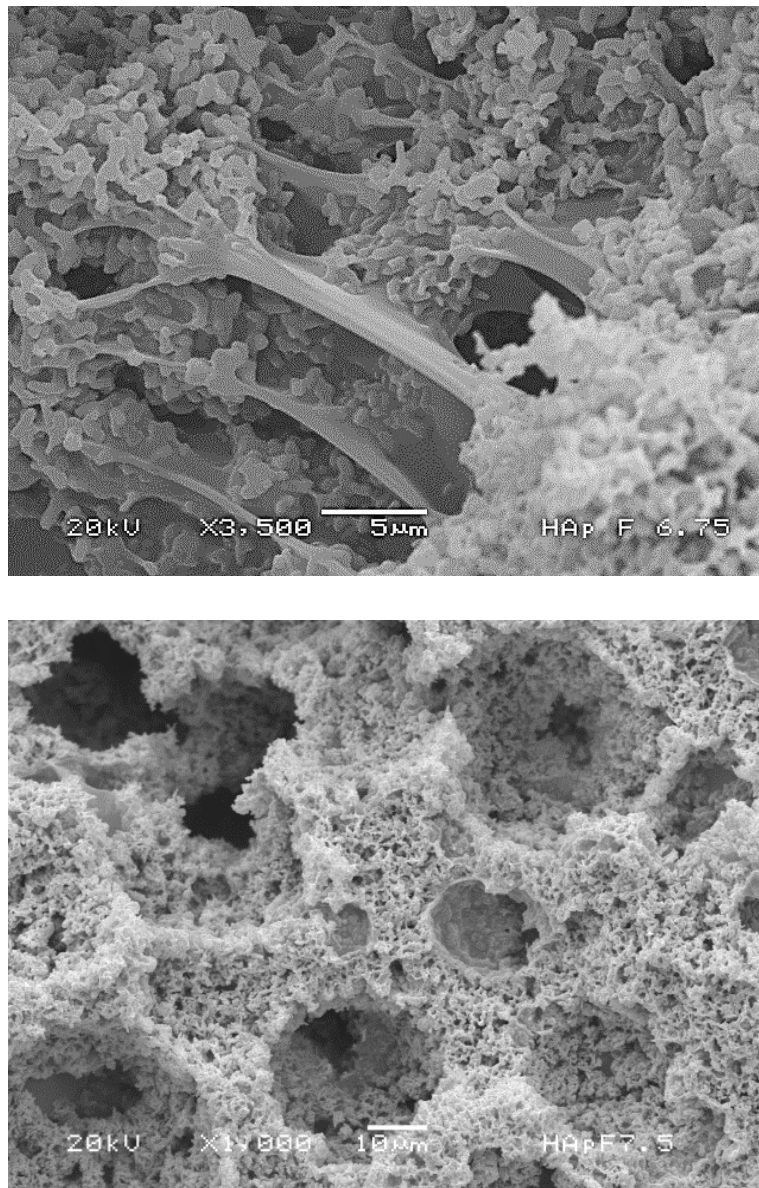


Figura 23: Micrografía SEM del material compuesto orgánico-inorgánico base HAp/grenetina.

Posteriormente se introduce la fase orgánica a las piezas (grenetina ó colágeno), de acuerdo al método descrito en el capítulo 2. En la Figura 23 se muestra, a diferentes ampliaciones, el material compuesto cuya fase orgánica corresponde a grenetina. La adición de la grenetina genera una continuidad en la estructura de la pieza, con lo cual se distribuyen los

esfuerzos de compresión, incrementando las propiedades mecánicas del material compuesto.

En la Figura 24 se presenta la morfología del material compuesto cuya fase orgánica corresponde al colágeno extraído de la cola de bovino. Se puede observar que tanto el colágeno (Figura 24) como la grenetina (Figura 23) forman una película que recubre la fase inorgánica sin disminuir la porosidad y las interconexiones obtenidas previamente.

Es importante destacar que, en ambos materiales compuestos (HAp/grenetina y HAp/colágeno), existen uniones de la fase orgánica en forma de "Y", similares a las que presentan los materiales orgánicos con estructuras celulares.

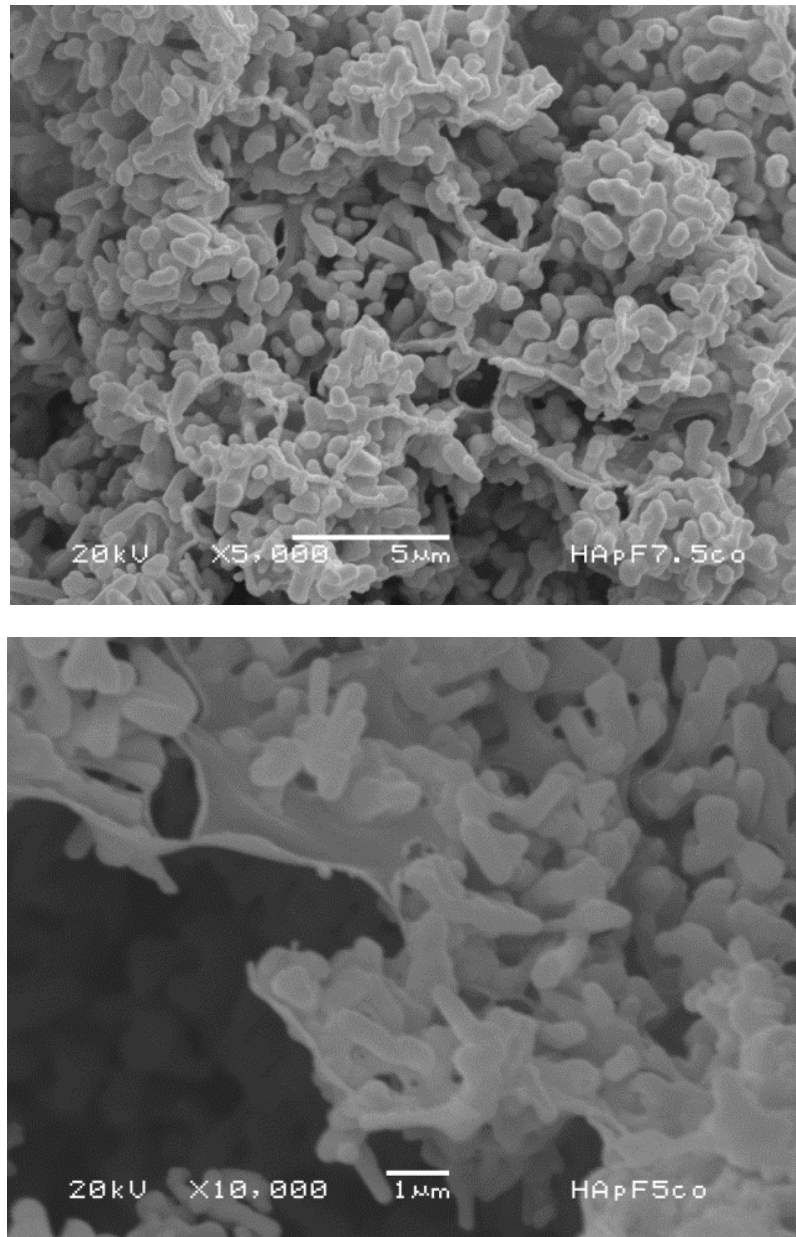
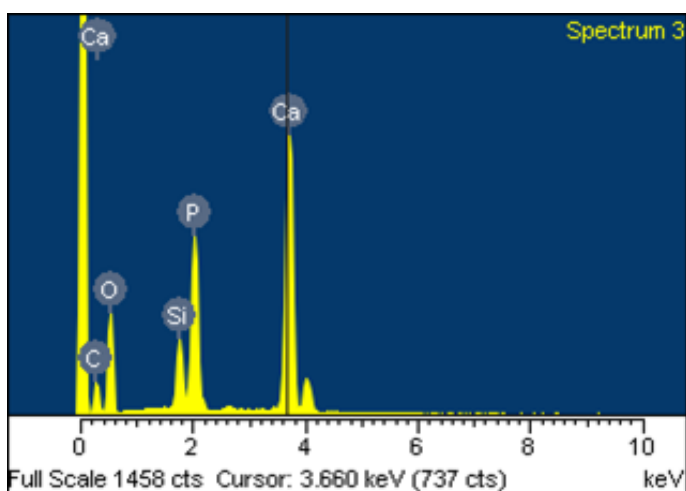


Figura 24: Micrografía SEM a 10,000X del material compuesto orgánico-inorgánico base HAp/colágeno.

4.2 Espectroscopía de energía dispersiva

El análisis químico en el microscopio electrónico de barrido se lleva a cabo midiendo la energía y la distribución de la intensidad de la señal de rayos x generada por un haz de electrones enfocados. [52]

En la Figura 25 se presenta el espectro de EDS y la tabla de porcentaje atómico de los elementos que constituyen a la hidroxiapatita, en el espectro se observan las señales provenientes de átomos de Ca, P, O y C correspondientes a la hidroxiapatita, obteniendo una relación atómica Ca/P de 1.77.



Elemento	% en peso	% atómico
C	15,25	24,56
O	44,30	53,57
Si	3,67	2,53
P	11,15	6,97
Ca	25,64	12,38
Ca/P=1.77		

Figura 25: Difractograma de EDS y tabla de porcentajes atómicos en un mapeo general de una muestra obtenida por PGCM después del tratamiento térmico.

El fosfato de calcio más comúnmente utilizado como biomaterial es la hidroxiapatita, cuya fórmula química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y que cuando posee una relación Ca/P de 1.67 se denomina HAp estequiométrica. Se ha reportado en la literatura que la hidroxiapatita de origen natural no es estequiométrica, teniendo relaciones Ca/P que van desde 1.2 hasta arriba de 1.7, y que

aquellas de origen sintético que poseen una relación atómica Ca/P menor de 1.0 no son aptas para ser utilizadas en el cuerpo. [53]

Por lo tanto, la relación Ca/P que presentan las piezas porosas de hidroxiapatita, obtenidas por el método gel casting modificado, sugiere que pueda ser adecuada para que estos materiales puedan ser utilizados como sustitutos de tejido óseo, disminuyendo la probabilidad de un rechazo por parte del organismo.

4.3 Difracción de Rayos X (XRD)

La Figura 26 muestra los patrones de difracción de (a) HAp pura (materia prima), (b) después del proceso gelcasting modificado y (c) posterior al tratamiento térmico.

La Hidroxiapatita se reconoce por las reflexiones de Bragg que corresponden a la estructura cuyo número de catálogo JCPDS es 09-0432; se indican las reflexiones más intensas, que corresponden a los planos con índices de Miller 002, 211, 112, 300, 130 de la HAp. Cabe hacer notar que los picos se presentan bien definidos, lo cual indica la presencia de hidroxiapatita altamente cristalina [33]. De acuerdo a los difractogramas presentados en la Figura 26: Difractogramas correspondientes a (a) hidroxiapatita inicial, (b) muestra obtenida por el proceso gelcasting modificado y (c) muestra obtenida por el proceso gelcasting modificado después del tratamiento térmico., es posible observar la permanencia de la estructura cristalina sin cambios significativos a pesar del tratamiento térmico realizado durante el proceso de

fabricación. Éstos resultados son muy importantes pues aseguran la estabilidad de las propiedades físicas de la hidroxiapatita.

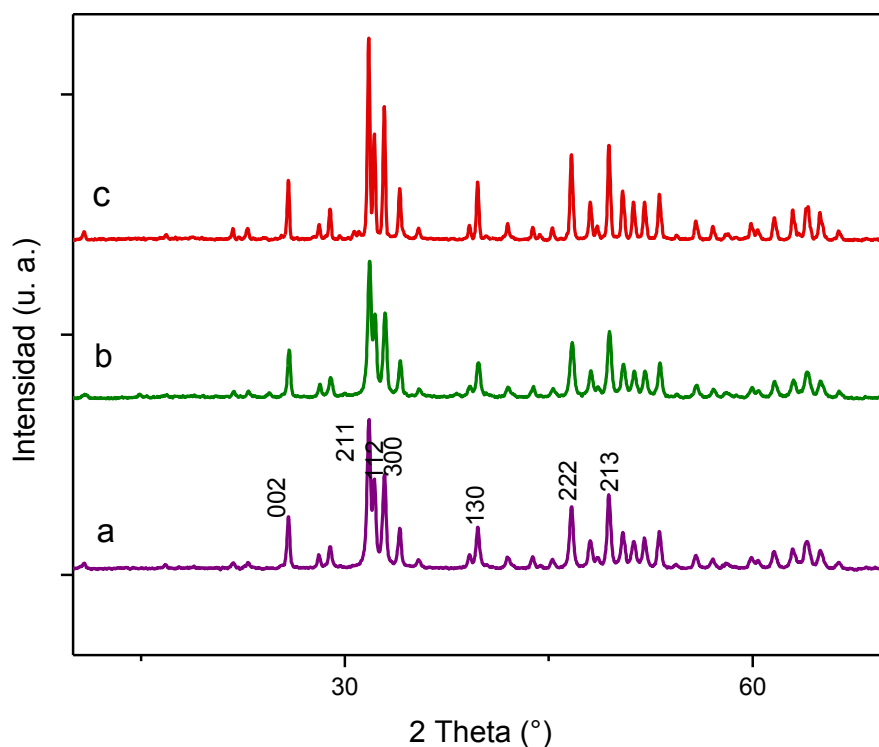


Figura 26: Difractogramas correspondientes a (a) hidroxiapatita inicial, (b) muestra obtenida por el proceso gelcasting modificado y (c) muestra obtenida por el proceso gelcasting modificado después del tratamiento térmico.

4.4 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 27 se muestran los espectros FTIR correspondientes a: la hidroxiapatita antes del Proceso Gel-Casting Modificado (a), microesferas de PMMA (b), posterior al moldeado de las piezas (HAp-PMMA) (c) y al finalizar el tratamiento térmico (d).

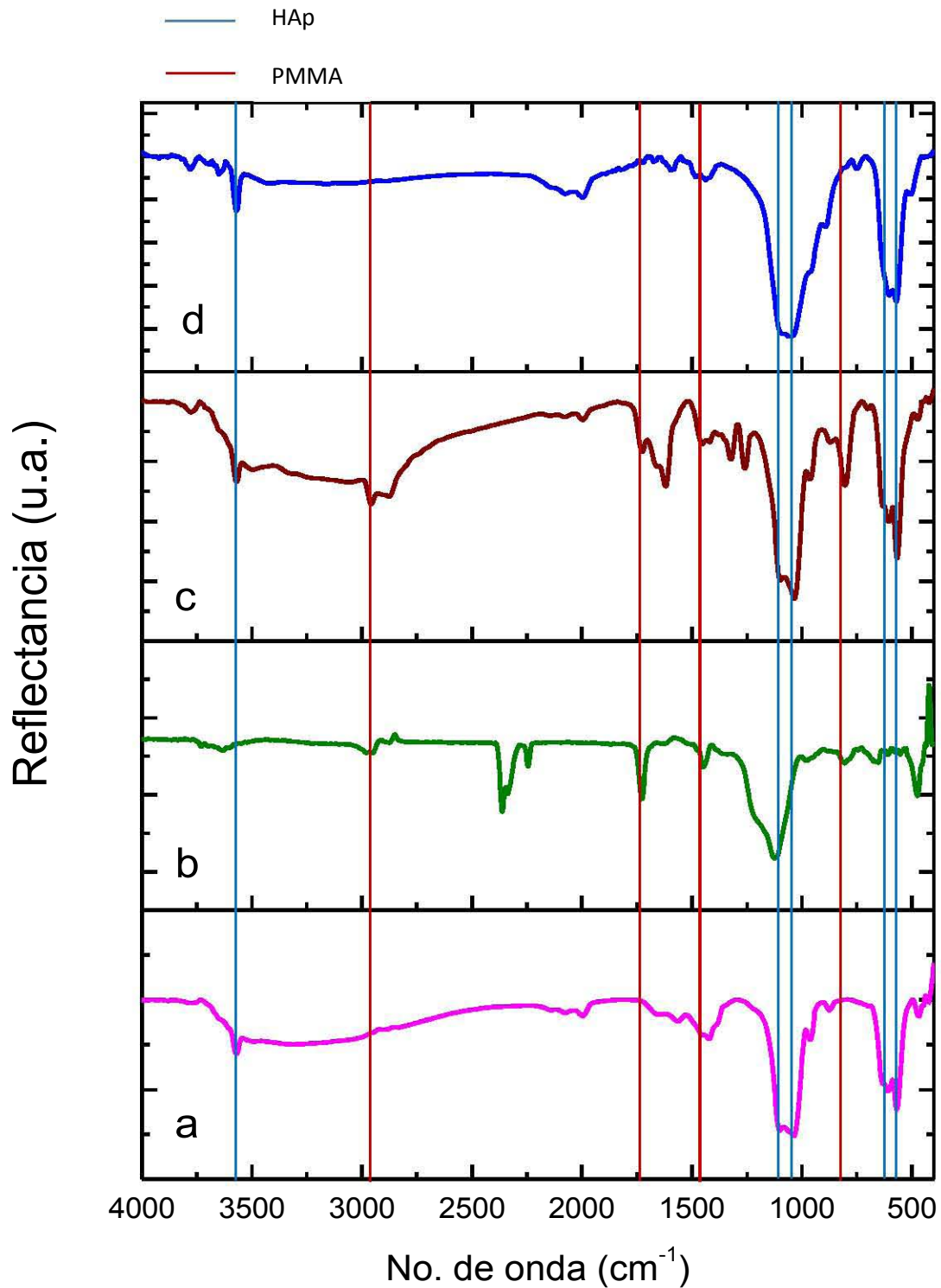


Figura 27: Espectros FTIR de a) hidroxiapatita antes del PGCM, b) microesferas de PMMA, c) posterior al moldeo de las piezas y d) al finalizar el tratamiento térmico.

Capítulo IV: Resultados y discusión

Una HAp típica (Figura 27 a y d), presenta las siguientes bandas principales: una banda ancha e intensa centrada alrededor de los 1033 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del grupo fosfato (PO_4^{3-}) y otras bandas en 563 y 600 cm^{-1} originadas por la deformación de dicho grupo [54]; la banda perteneciente al ion hidroxilo (OH^-) se observa en 3600 cm^{-1} aproximadamente. La banda en 1450 cm^{-1} podría corresponder al estiramiento de la sustitución del grupo CO_3^{2-} .

En el espectro (c) podemos observar la combinación de las bandas correspondientes a la HAp (Figura 27a) y al PMMA (Figura 27b) utilizado como agente formador de poros. Se aprecian las vibraciones, descritas previamente, de la fase inorgánica y se observan algunas bandas correspondientes al polímero, como por ejemplo en 1727 cm^{-1} aproximadamente, perteneciente al grupo carboxil acrilato [55]. También se observan otras bandas, alrededor de los 1260 cm^{-1} , que son asociadas a la presencia de los polímeros utilizados durante el PGCM.

En el espectro (d), obtenido posterior al tratamiento térmico, las bandas correspondientes tanto a la mezcla polimérica utilizada durante el moldeado, como a las esferas de PMMA han desaparecido, lo cual nos indica que el dicho tratamiento ha eliminado completamente esta fase y que las piezas finales moldeadas de HAp han conservado sus propiedades químicas, lo cual es un resultado muy importante. En otras palabras, dado que los espectros (a) y (d) presentan únicamente las bandas características de la hidroxiapatita, es posible asegurar que el PGCM y la adicción de las microesferas de PMMA no afectan las propiedades químicas del material después de haberlo moldeado e inducido la formación de macroporos.

La Figura 28 muestra los espectros correspondientes de a) hidroxiapatita al finalizar el tratamiento térmico, b) grenetina comercial y c) material compuesto hidroxiapatita-grenetina. En el espectro correspondiente a la grenetina (b) se observan bandas principalmente en 1650 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de amidas I; en 1540 y 1547 cm^{-1} , correspondientes a las amidas II y en 1237 cm^{-1} , correspondiente a las amidas III. Para la unión C-O de los grupos carboxilatos existe una banda vibracional en 1085 cm^{-1} . [12, 56]

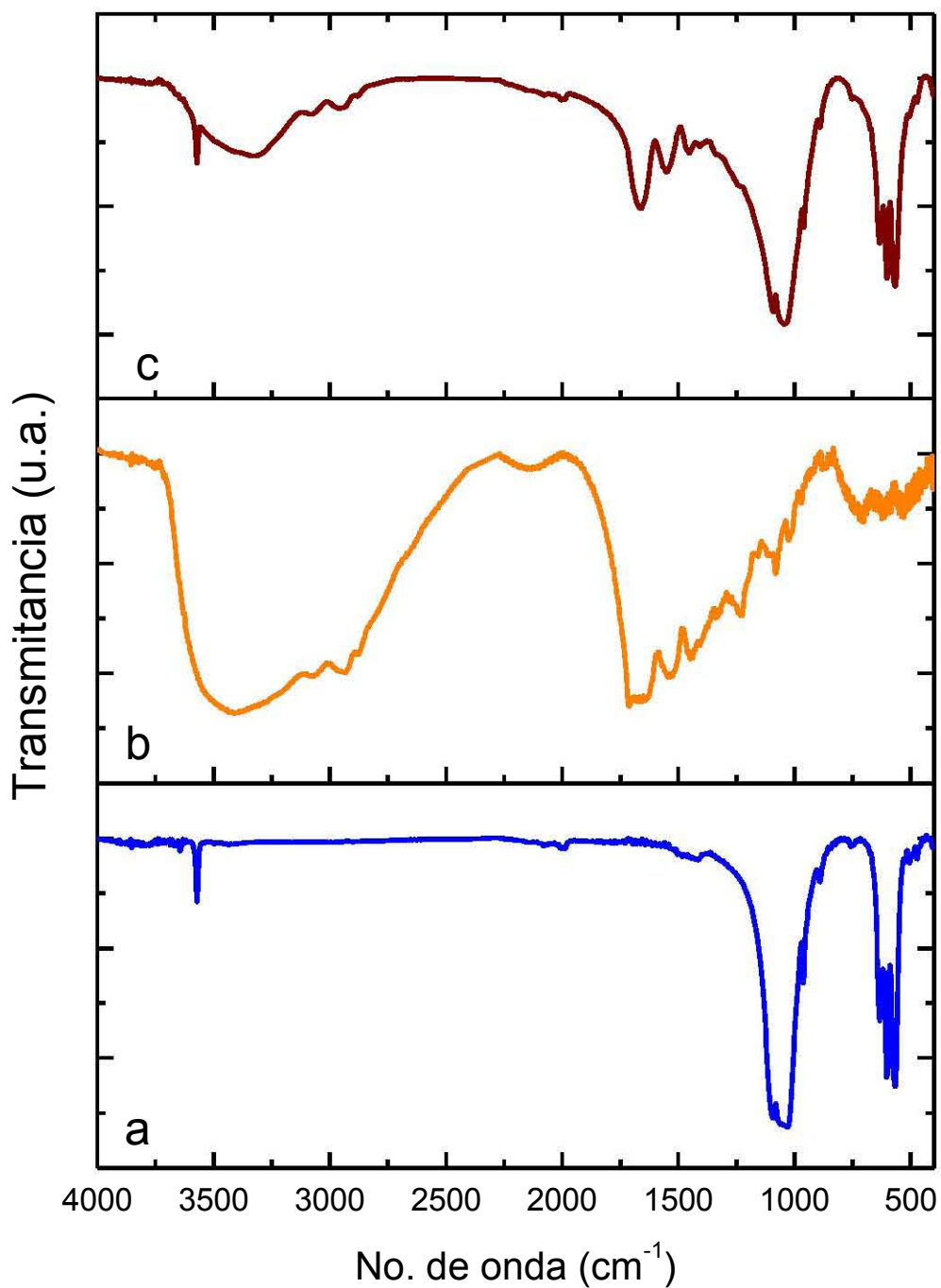


Figura 28: Espectros FTIR de a) hidroxiapatita al finalizar el tratamiento térmico, b) grenetina y c) material compuesto hidroxiapatita-grenetina.

En la Figura 28 es posible apreciar que el material compuesto obtenido (espectro c) presenta la combinación de las vibraciones correspondientes tanto a la fase orgánica como a la inorgánica, descritas previamente. Además, se observa que la adición de la grenetina no genera un cambio evidente en la estructura química de la HAp.

Finalmente, en la Figura 29, se presentan las gráficas correspondientes a los espectros FTIR de a) hidroxiapatita al finalizar el tratamiento térmico, b) colágeno y c) material compuesto HAp-colágeno.

El espectro del colágeno extraído de la cola de bovino presenta las mismas vibraciones que la grenetina (Figura 28b), debido a que la grenetina proviene de la desnaturalización de dicha proteína.

En la Figura 29, también se muestran las bandas correspondientes al material compuesto HAp-colágeno y, al igual que el material compuesto anterior (HAp-grenetina), es posible concluir que la incorporación de la proteína no modifica la estructura química de la HAp.

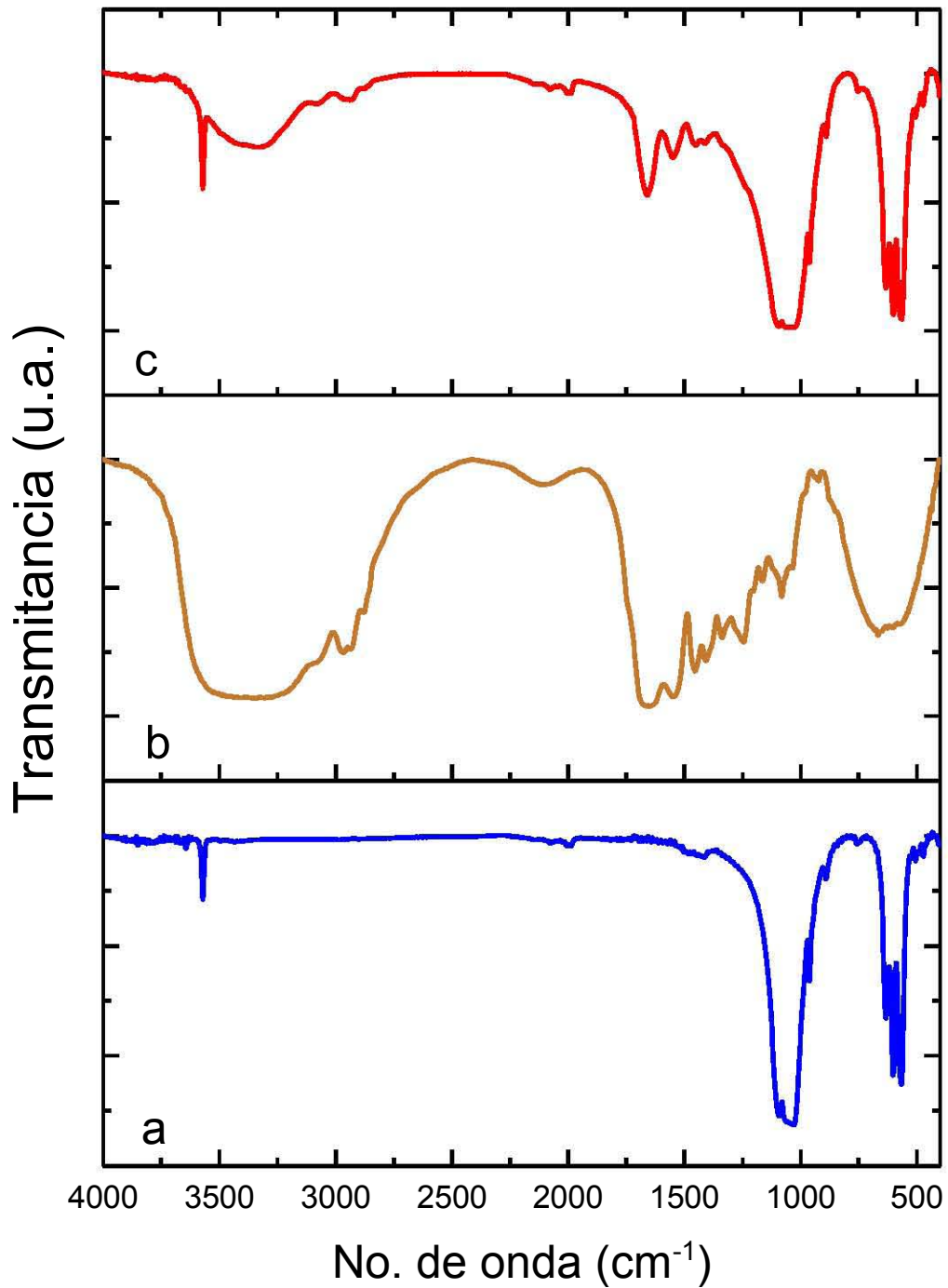


Figura 29: Espectros FTIR de a) hidroxiapatita al finalizar el tratamiento térmico, b) colágeno y c) material compuesto hidroxiapatita-colágeno.

4.5 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de un implante óseo deberían ser semejantes a las propiedades de los huesos receptores y así transferir adecuadamente la carga. Estas propiedades varían dependiendo del tipo de hueso. El esfuerzo máximo a la compresión varía entre 100 y 200 MPa para el hueso compacto y entre 2 y 20 MPa para el hueso trabecular. [57, 58].

En la siguiente gráfica (Figura 30) se muestra un comportamiento típico de las piezas del material compuesto a base de hidroxiapatita, obtenido cuando se somete a una prueba de compresión.

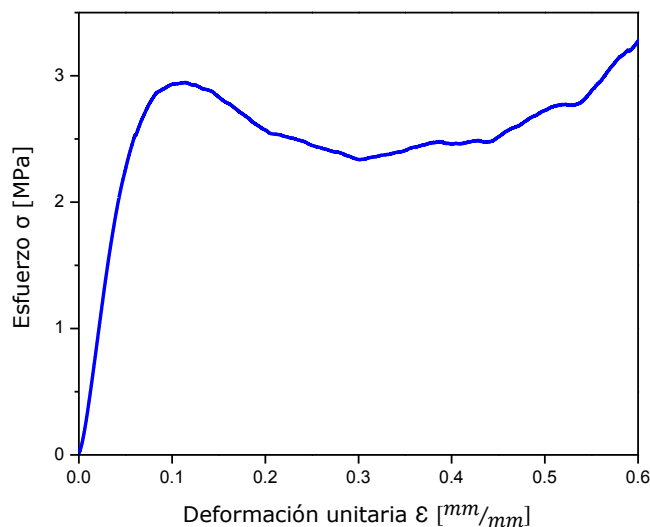


Figura 30: Comportamiento típico de un material compuesto orgánico-inorgánico base HAp, el cual presenta un comportamiento típico de un material celular.

Se observa que el material compuesto obtenido presenta un comportamiento no lineal, típico de un material celular. Este tipo de materiales pueden definirse como un ensamblaje de celdas prismáticas o poliédricas (con bordes

sólidos y caras) agrupadas de tal modo que forman mallas bidimensionales o tridimensionales y rellenan un plano o el espacio. En función del tipo de estructura interna, los sólidos celulares pueden ser de celda cerrada, de celda abierta o mixta.

La estructura del sólido será de celda abierta cuando la masa de la misma se encuentre contenida en las aristas de las celdas. La estructura será de celda cerrada cuando la masa se halle concentrada en las aristas y caras de las celdas, aislando cada celda de las contiguas (Figura 31)

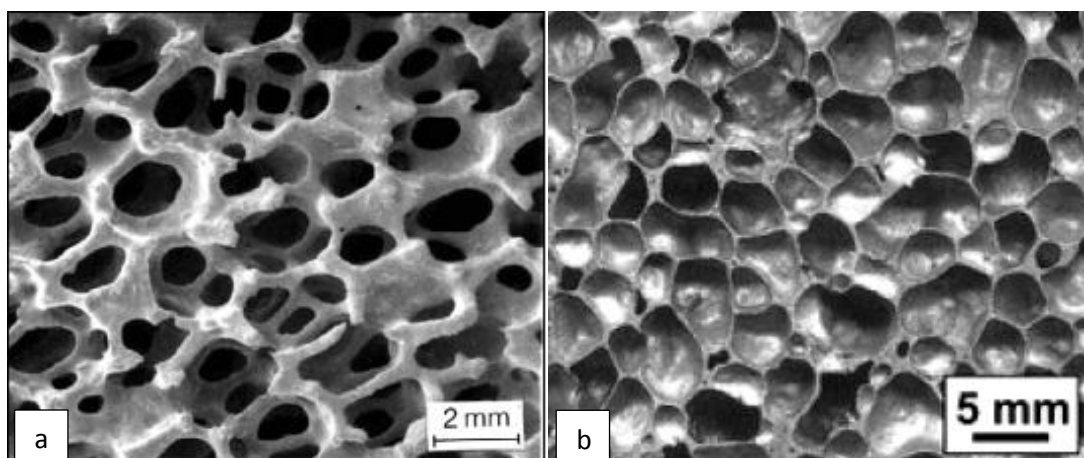


Figura 31: Materiales celulares de celda abierta a) (Espuma de níquel) y de celda cerrada. b) (espuma metálica). [59]

Estos materiales poseen propiedades que pueden medirse a través de los mismos métodos que se usan para los sólidos densos. Su particular microestructura hace que estos materiales sean ligeros conservando elevados valores de resistencia, dureza, área de contacto y permeabilidad. Por tanto, sus propiedades específicas suelen ser muy buenas. [59]

Considerando lo anterior, podemos asumir que el material compuesto orgánico-inorgánico obtenido corresponde a un material celular de celdas

abiertas, similar a la estructura del tejido óseo. Lo anterior es notable pues se ha obtenido un material con características fisicoquímicas estructurales y morfológicas muy similares a las de un material de origen natural como lo es el hueso.

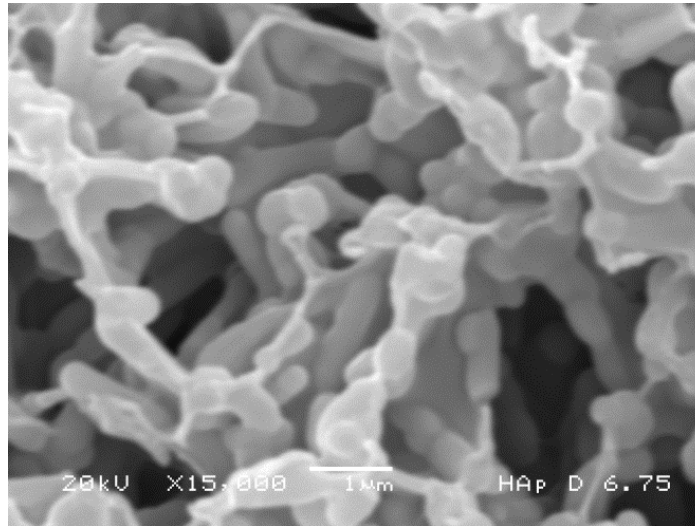


Figura 32: Micrografía SEM a 15,000X del material compuesto orgánico-inorgánico base HAp, presentando estructura de material celular

En la Figura 32 se puede observar la estructura formada por la fase orgánica, la cual recubre a la hidroxiapatita formando arreglos en forma de "Y". Estas distribuciones se presentan típicamente en un material celular y son responsables, en buena medida, del comportamiento mecánico exhibido por estos materiales, mismo que puede ser explicado de la siguiente manera.

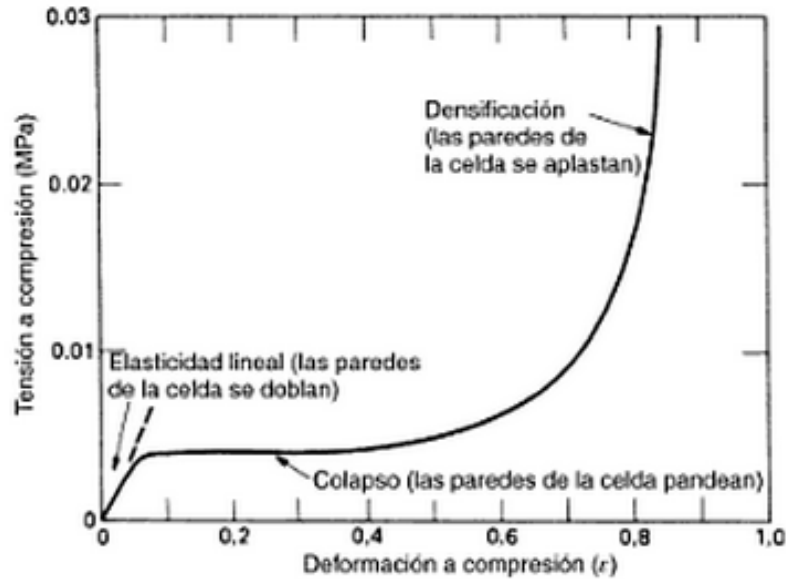


Figura 33: Curva esfuerzo-deformación a compresión para una espuma polimérica. Pueden producirse grandes deformaciones a compresión, ya que la espuma absorbe gran cantidad de energía cuando es aplastada. [60]

Cuando se comprime un material celular, la curva esfuerzo-deformación presenta tres regiones (Figura 33). A pequeñas deformaciones, la espuma se deforma de manera *elástica lineal*; después hay una *meseta* casi constante con la deformación, donde a muy pequeños esfuerzos hay grandes deformaciones, y finalmente hay una región de *densificación* cuando las celdas han colapsado y se aglomeran juntas. [60]

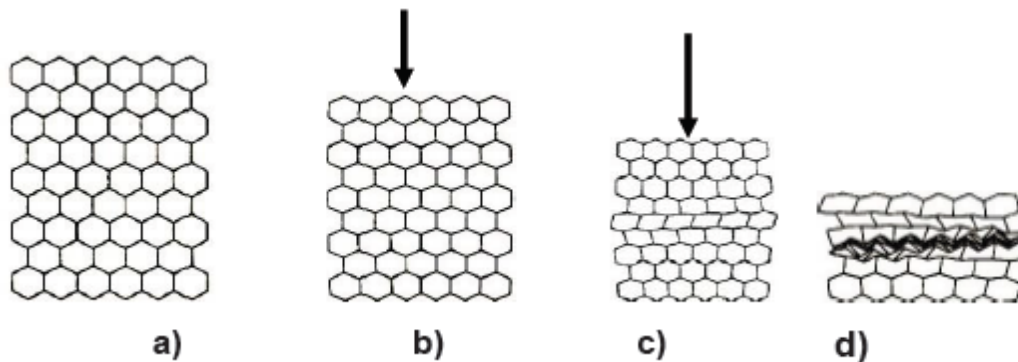
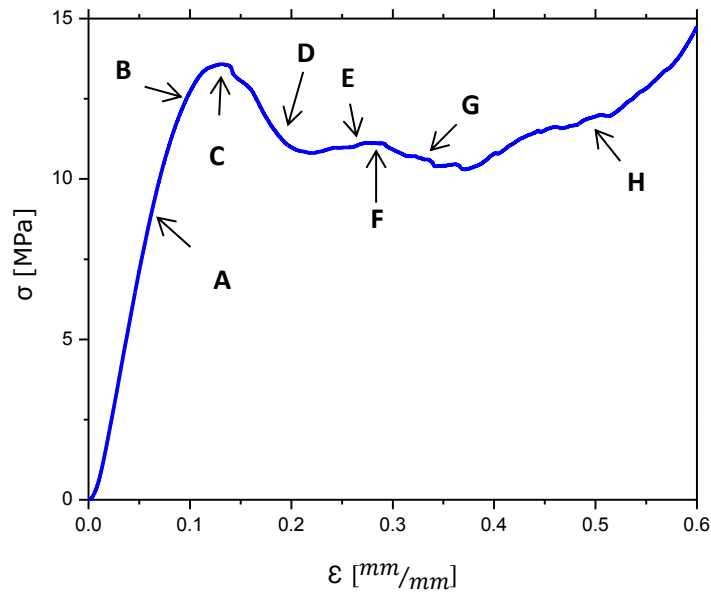


Figura 34: Esquema del comportamiento del material compuesto base hidroxiapatita obtenido, el cual representa un material celular. a) Zona de deformación elástica de las celdas, b) "doblamiento" de las paredes de la celda bajo esfuerzo de compresión, presentando deformación plástica, c) esfuerzo máximo, d) colapso de las celdas e) densificación del material.

En el esquema de la Figura 34 se representan las etapas ocurridas durante el ensayo de compresión del material compuesto obtenido. Estos materiales presentan las regiones descritas previamente de un material celular, Figura 33. En la zona A las celdas del material soportan el esfuerzo aplicado sufriendo una deformación elástica; al llegar a la zona B, cuando se presenta un cambio en la pendiente de la gráfica, éstas sufren una deformación plástica. El

Capítulo IV: Resultados y discusión

esfuerzo máximo que soporta el material celular, se encuentra en el punto C, y se presenta cuando las celdas constituyentes comienzan a sufrir una deformación permanente. El colapso de las células da lugar a la región D, ocasionando una densificación parcial del material

Posteriormente, existe una recuperación del esfuerzo soportado (zona E). Este comportamiento es ocasionado por la presencia de los microporos del material, los cuales se comportan de manera similar a los macroporos, soportando el esfuerzo de manera elástica, pasando por una deformación plástica hasta llegar a la carga máxima soportada por éstos (punto F). En la región G se presenta el colapso de los microporos, lo cual provoca la densificación total del material. Este evento genera un incremento exponencial de la resistencia a la compresión en la gráfica esfuerzo-deformación), del material compuesto orgánico-inorgánico base hidroxiapatita.

Un aspecto importante que cabe resaltar es el hecho de que el material compuesto obtenido presenta una estructura jerárquica en cuanto a la porosidad y, como consecuencia, existe este comportamiento "bimodal" en la resistencia mecánica a la compresión. Esto también contribuirá al desempeño del material una vez implantado y en uso por el paciente.

Para comparar el efecto de la cantidad de fase orgánica en el material compuesto, se presenta la Figura 35. En esta gráfica se observan los comportamientos promedio de las piezas moldeadas de HAp con las 5 concentraciones diferentes de grenetina que se añadieron. Así mismo, se representa una pieza control, a la cual no se añadió fase orgánica (SFO, línea negra).

Es posible apreciar que el aumento en la concentración de la fase orgánica genera un incremento del esfuerzo máximo de compresión, generando un efecto sinérgico, de dos órdenes de magnitud (de alrededor del 200%), en comparación con las muestras sin fase orgánica.

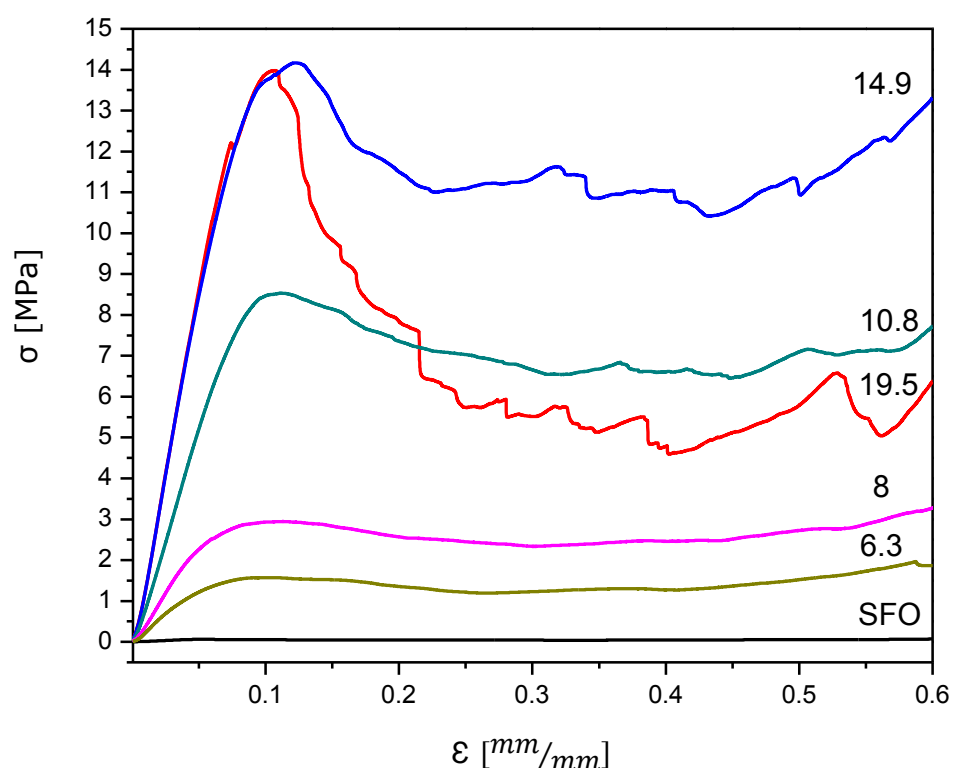


Figura 35: Esfuerzo a la compresión de materiales compuestos base HAp con diferentes concentraciones de grenetina como fase orgánica.

El mayor esfuerzo a la compresión se obtuvo en las piezas más porosas (HAp F, Tabla 10), y con mayor concentración de grenetina, 19.5% en peso), fue de 18 MPa. Este valor supera en un 320% los valores reportados en la literatura (mencionados en la Tabla 6) para hueso esponjoso, y se encuentra en el mismo orden de valores reportados para el hueso cortical esponjoso.

Los esfuerzos promedio a la compresión de las muestras a las que se les aplicó colágeno como fase orgánica, se grafican en la Figura 36. Es posible observar un incremento en dichos esfuerzos máximos en relación al aumento de colágeno como fase orgánica, Estos resultados son congruentes con los que se obtuvieron de las muestras con grenetina como fase orgánica, Figura 35.

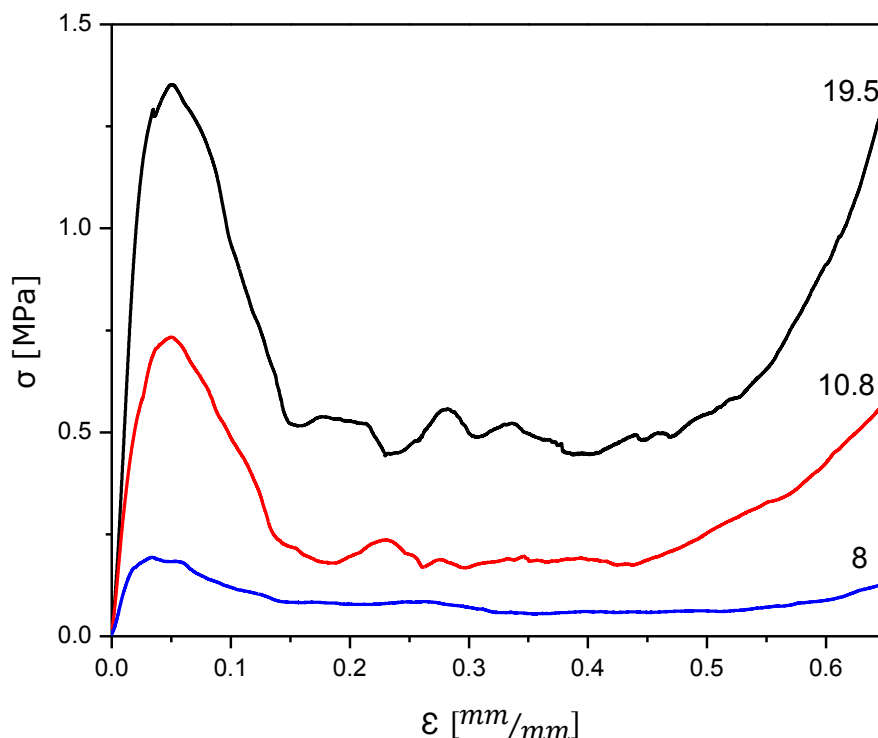


Figura 36: Esfuerzo a la compresión de materiales compuestos base HAp E con diferentes concentraciones de colágeno como fase orgánica.

En el caso del colágeno, el esfuerzo máximo obtenido, para un porcentaje de fase orgánica de 19.5 (Tabla 9), fué de 13.2 MPa, lo cual corresponde a la muestra HAp F con mayor concentración de dicha fase. Comparando estos resultados con las piezas a las que se les aplicó grenetina, Figura 35, es claramente evidente que la grenetina presenta mayor sinergia en las propiedades mecánicas del material compuesto. Este efecto puede ser causado

por la diferencia que existe entre el tamaño de las cadenas moleculares del colágeno y la grenetina, siendo el de esta última de menor tamaño, lo cual favorece la integración de dicha fase dentro de la matriz cerámica. De cualquier forma, la presencia del colágeno también se traduce en un incremento sinérgico de la resistencia mecánica a la compresión, de tal forma que las piezas que contienen esta fase orgánica presentaron un incremento de 234% comparadas con la reportada en la literatura para hueso cortical y se encuentran en el mismo orden de magnitud que la reportada para hueso cortical esponjoso.

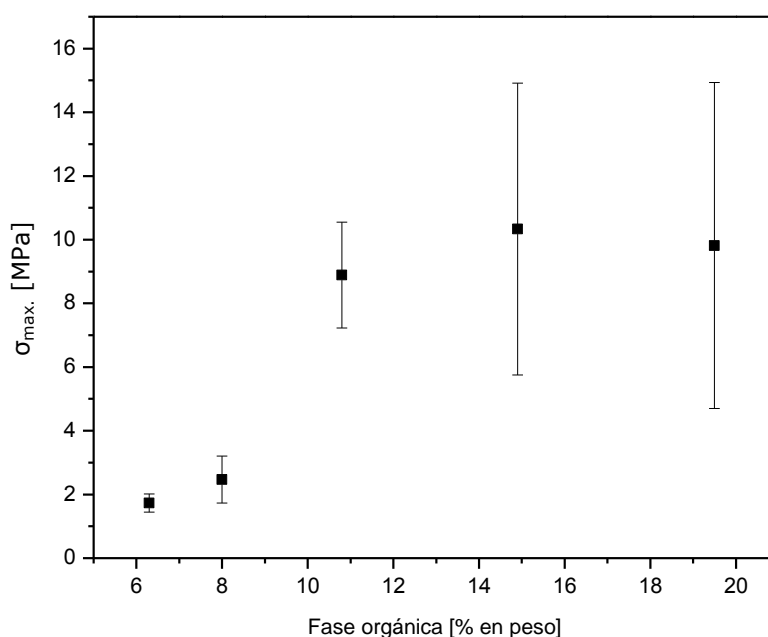


Figura 37: Variación del esfuerzo máximo en compresión con respecto a la concentración de la fase orgánica incluyendo el error experimental.

La Figura 37 corresponde a una gráfica que muestra la relación entre la concentración de la fase orgánica (grenetina) y el esfuerzo máximo promedio de cada una de las diferentes porosidades preparadas, que soportan las

muestras analizadas en compresión. En este gráfico se presenta la desviación estándar de los datos obtenidos.

La Figura 38 muestra el ajuste de la curva correspondiente al comportamiento del esfuerzo máximo a compresión con respecto a la concentración de la fase orgánica, realizado con el programa de cómputo Origin Pro 8®.

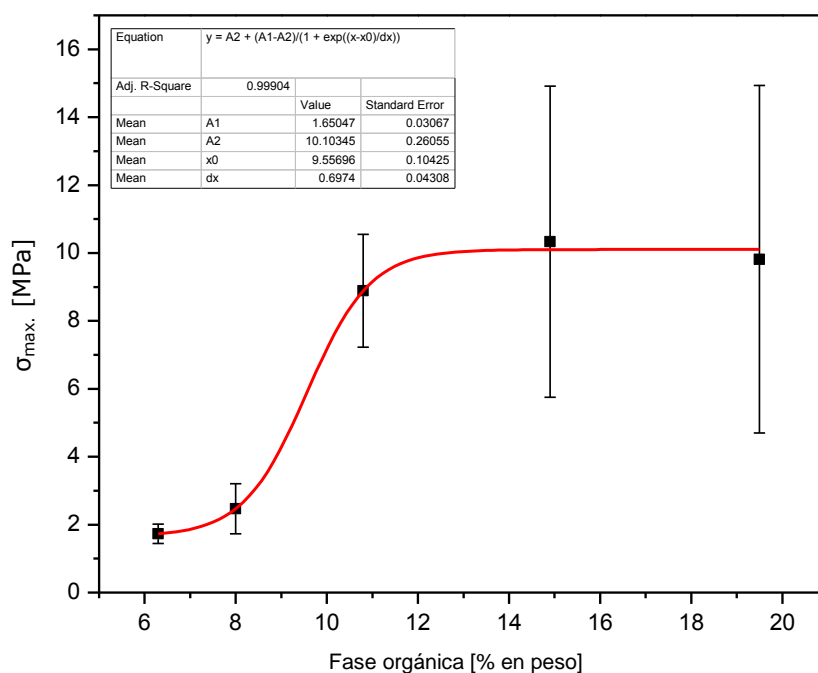


Figura 38: Ajuste de la curva correspondiente al comportamiento del esfuerzo máximo a la compresión con respecto a la concentración de la fase orgánica.

El ajuste corresponde a una función de la forma "Sigmoide de Boltzmann" y presentan una correlación de 0.99904.

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x - x_0)/dx}}$$

Ecuación 5

Donde los parámetros de la $y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x - x_0)/d_x}}$ Ecuación

5 se establecen de acuerdo a la Figura 39, de la siguiente forma: los parámetros A_1 y A_2 representan los valores mínimo y máximo respectivamente, de los esfuerzos de compresión máximos obtenidos para cierta concentración de fase orgánica. El término x_0 representa la concentración a la cual el esfuerzo máximo σ_{max} tiene el valor medio entre los valores máximo y mínimo (A_1 y A_2), por último d_x representa la pendiente de la curva en el punto x_0 .

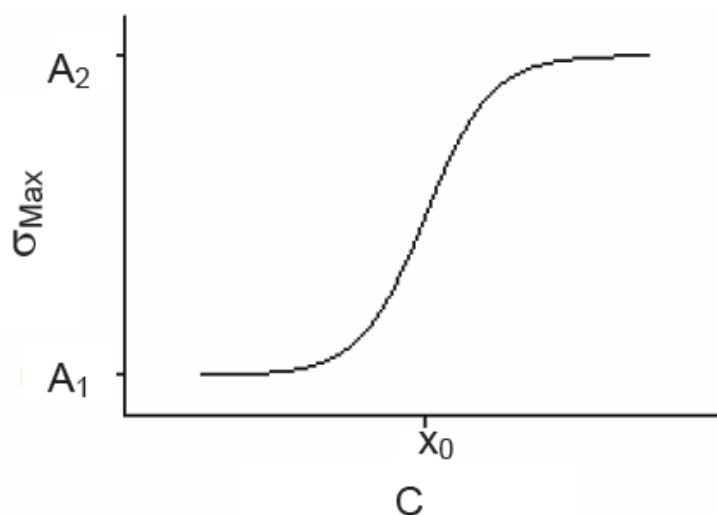


Figura 39: Curva tipo sigmoide de Boltzmann donde se muestra los parámetros que la definen.

Por lo tanto, de los valores obtenidos del ajuste realizado en la Figura 38, se obtienen los siguientes valores:

$$A_1 = 1.65047 \pm 0.03067 \text{ MPa}$$

$$A_2 = 10.1034 \pm 0.26055 \text{ MPa}$$

$$x_0 = 9.55696 \pm 0.10425 \%$$

$$d_x = 0.6974 \pm 0.04308 \text{ MPa}/\%$$

y de acuerdo a la $y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x - x_0)/dx}}$ Ecuación 5, es posible calcular el esfuerzo máximo promedio, en relación a la cantidad de fase orgánica añadida, de la siguiente forma:

$$\sigma_{max} = 10.1034 + \frac{1.65047 - 10.1034}{1 + e^{(\% - 9.55696)/0.6974}} \text{ MPa}$$

Este ajuste representa un resultado muy importante porque es posible determinar el esfuerzo a la compresión que se obtendrá al añadir determinada cantidad de fase orgánica, así como conocer la cantidad de dicha fase que nos generará los mejores resultados en los ensayos de compresión.

CAPÍTULO V

Conclusiones y perspectivas.

La presente investigación se enfocó en el control de la macroporosidad de materiales compuestos de matriz cerámica adicionando esferas de PMMA al proceso gelcasting modificado; posteriormente, el material polimérico fue eliminado por medio de un tratamiento térmico y se le añadió una fase orgánica con el objetivo de incrementar las propiedades mecánicas de las piezas cerámicas.

Del análisis de los resultados obtenidos podemos concluir que, por medio del proceso gelcasting modificado es posible obtener piezas de HAp con porosidad controlada, en diversas morfologías.

Se obtuvieron materiales celulares de celda abierta, es decir cuya porosidad estaba interconectada, tanto por macro como por microporos, lo cual

favorecerá la penetración de células, vascularización y crecimiento de tejido óseo, mejorando la biocompatibilidad del implante.

Los análisis de difracción de rayos X demuestran que no se presenta ningún cambio en la estructura cristalina de la hidroxiapatita y los espectros obtenidos por IR y EDS indican que su composición química no se altera durante el proceso gelcasting modificado, de tal manera que la biocompatibilidad de la HAp prevalecerá al finalizar el proceso de fabricación de un implante.

La integración de una fase orgánica incrementa de forma sinérgica las propiedades mecánicas dando lugar a un material compuesto con propiedades mecánicas similares a las del hueso.

El esfuerzo máximo a la compresión obtenido fue de 18 MPa, para las muestras con grenetina, y de 13.2 MPa para las que contenían colágeno. Estos valores representan una resistencia mecánica de 3.2 y 2.3 veces mayor, respectivamente, que la reportada para el hueso esponjoso, lo cual resalta el potencial de estos materiales para ser utilizados como sustitutos de hueso esponjoso o cortical esponjoso.

La adición de microesferas de PMMA al PGCM para la obtención de piezas cerámicas porosas no afecta las propiedades del material compuesto. La adición de la fase orgánica, para la obtención del material compuesto, no afecta considerablemente la porosidad ni sus interconexiones.

El uso de la grenetina como fase orgánica, confiere un aumento mayor a las propiedades mecánicas en comparación con el colágeno extraído de la cola de

bovino, lo cual puede ser debido a la diferencia de las dimensiones de las cadenas poliméricas, las cuales al disminuir su tamaño favorecen la integración de dicha fase en las piezas cerámicas porosas.

Finalmente, dados los resultados obtenidos, es posible concluir que se obtuvo un material con propiedades fisicoquímicas, estructurales, morfológicas y mecánicas muy similares a las del tejido óseo natural, o, dicho de otra forma, un material biomimético, con tecnología propia y que requiere de poco gasto de energía en su fabricación, lo cual resalta la contribución a la ciencia e ingeniería de materiales del presente trabajo.

Perspectivas

Es necesario conocer la densidad relativa de los materiales celulares obtenidos por el PGCM, y se debe comparar este resultado con muestras óseas, si los resultados son similares se promoverá la aceptación del bioimplante.

Se debe medir con mayor precisión la porosidad existente en el material compuesto. Debido a que esta propiedad es un factor importante en la biocompatibilidad de un implante.

Referencias.

- [1] LeGeros, J. Parsons, G. Daculsi, F. Driessens, D. Lee, S. Liu, S. Metsger, D. Peterson y M. Walker, «Significance of the porosity and physical chemistry of calcium phosphate ceramics. Biodegradation-Bioresorption.,» *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, nº 523, pp. 268-271.
- [2] P. K. Chu y X. Liu, *Biomaterials Fabrication and Processing. Handbook*, CRC Press, 2008.
- [3] U. Welsh, *Histología*, Editorial Médica Panamericana, 2009.
- [4] D. W. Fawcett, *Tratado de Histología*, Madrid, España: Mc Graw Hill, 1995.
- [5] G. J. Tortora y B. Derrickson, *Principios de Anatomía y Fisiología*, México, D.F.: Médica Panamericana, 2006.
- [6] F. Geneser, *Histología. Sobre bases moleculares*, Madrid, España: Medica Panamericana, 2000.
- [7] K. K. Gómez Lizárraga, *Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón de bovino. Tesis de Maestría.*, México, D.F., 2010.
- [8] A. L. Lehninger, «Bioquímica,» de *Las bases moleculares de la estructura y función celular*, Barcelona, Ediciones Omega, S. A., 1995.
- [9] J. Brinckmann, H. Notbohm y P. Müller, «Collagen: primer in structure, processing and assembly,» *Topics in current chemistry*, vol. 247, pp. 1-6, 2005.
- [10] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen y J. E. Lemons , *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*, San Diego, California: Academic Press, 1996.
- [11] J. Campa Molina, G. S. Ulloa Godínez, L. Bucio Galindo, I. A. Belío, R. Velazquez y E. M. Rivera Muñoz, *Biomateriales. Fundamentos, técnicas y aplicaciones.*, Jálisco, México: Universidad de Guadalajara, 2007.
- [12] P. C. M. Alvarez, *Síntesis y caracterización de un material compuesto a base de hidroxiapatita con propiedades similares a la del tejido óseo natural. Tesis de Maestría*, Querétaro, Qro., 2009.
- [13] D. VAsudevan, S. S y K. Vaidyanathan, *Testbook of Biochemistry for Medical Students*, New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2011.

- [14] A. M. Ferreira, P. Gentile, V. Chiono y G. Ciardelli, «Collagen for bone tissue regeneration. Review,» *Acta Biomaterialia*, vol. 8, pp. 3191-3200, 2012.
- [15] C. H. Lee, A. Singla y Y. Lee, «Biomedical applications of collagen. Review,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 221, pp. 1-22, 2001.
- [16] L. Cen, W. Liu, L. Cui, W. Zhang y Y. Cao, «Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications,» *Pediatric Research*, vol. 63, nº 5, 2008.
- [17] P. K. Chu y X. Liu, de *Biomaterials fabrication and processing Handbook*, United States of America, CRC Press, 2008.
- [18] R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin y F. Berthod, «Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. Review,» *Materials*, vol. 3, pp. 1863-1867, 2010.
- [19] S. Teng, J. Shi y L. Chen, «Formation of calcium phosphates in gelatin with a novel diffusion system,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 49, pp. 87-92, 2006.
- [20] G. M. I. o. America, «Gelatin Handbook».
- [21] R. Schrieber y H. Gareis, *Gelatin Handbook. Theory and Industrial Practice*, Germany: Wiley-VCH, 2007.
- [22] S. Best, A. Porter, E. Thian y J. Huang, «Bioceramics: Past, present and for the future,» *Journal of the European Ceramic Society*, nº 28, pp. 1319-1327, 2008.
- [23] «Deporte y nutrición,» [En línea]. Available: <http://www.deporteynutricion.net/Articulos/lesiones-articulo44.aspx>. [Último acceso: Noviembre 2012].
- [24] C. H. Turner, «Bone Strength: Current Concepts,» *Annals New York Academy of Sciences*, nº 1068, pp. 429-446, 2006.
- [25] S. V. Bhat, *Biomaterials*, Bombay, India: Alpha Science International Ltd, 2005.
- [26] A. Ravaglioli y A. Krajewski, «Bioceramics. Materials, properties and applications,» Great Britain, Chapman & Hall, 1992.
- [27] C. A, *Actualización en Cirugía Ortopédica y Traumatología*, Barcelona, España: Masson, 2003.
- [28] J. Arias, *Propedéutica quirúrgica*, Tebar, 2004, p. 426.

- [29] M. Ortega Andreu, Recambios protésicos de rodilla, Médica Panamericana, 2001.
- [30] D. Shi, Introduction to biomaterials, China: Tsinghua University Press and World Scientific Publishing Co., 2006.
- [31] M. V. García-Garduño y J. Reyes-Gasga, «La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica.,» *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 9, nº 2, pp. 90-95, 2006.
- [32] M. E. Londoño, A. Echavarría y F. De La Calle, «Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas,» *Escuela de Ingeniería de Antioquia*, nº 5, pp. 109-118, 2006.
- [33] G. Tripathi y B. Basu, «A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations,» *Ceramics International*, 2011.
- [34] J.-C. Hornez, F. Chai, F. Monchau, N. Blanchemain, M. Descamps y H. Hildebrand, «Biological and physico-chemical assessment of hydroxyapatite (HA) with different porosity,» *Biomolecular Engineering*, vol. 24, pp. 505-509, 2007.
- [35] S. Swain, S. Bhattacharyya y D. Sarkar, «Preparation of porous scaffold from hydroxyapatite powders,» *Materials Science and Engineering C*, vol. 31, pp. 1240-1244, 2011.
- [36] F.-Z. Zhang, T. Kato, M. Fuji y M. Takahashi, «Gelcasting fabrication of porous ceramics using a continuous process,» *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 26, pp. 667-671, 2006.
- [37] M. Descamps, J. Hornez y A. Leriche, «Manufacture of hydroxyapatite beads for medical applications,» *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 29, pp. 369-375, 2009.
- [38] J. M. Cordell, M. L. Vogl y A. J. Wagoner Johnson, «The influence of micropore size on the mechanical properties of bulk hydroxyapatite and hydroxyapatite scaffolds,» *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, vol. 2, pp. 560-570, 2009.
- [39] E. Rivera-Muñoz, J. Díaz, J. R. Rodríguez y W. Brostow, «Hydroxyapatite spheres with controlled porosity for eye ball prosthesis: processing and characterization,» *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 12, pp. 305-3011, 2001.
- [40] E. Rivera-Muñoz, R. Velázquez y R. Rodríguez, «Improvement in mechanical properties of hydroxyapatite objects with controlled porosity made by modified gelcasting process,» *Materials Science Forum*, Vols. %1 de %2426-432, pp. 4489-4494, 2003.

- [41] E. M. Rivera-Muñoz, R. Velázquez y P. Muñoz-Álvarez, «Mechanical characterization of hydroxyapatite-based organic-inorganic composites,» *Materials Science Forum*, Vols. %1 de %2539-543, pp. 583-588, 2007.
- [42] S. Padilla, M. Vallet-Regí, M. Ginebra y F. Gil, «Processing and mechanical properties of hydroxyapatite pieces obtained by the gelcasting method,» *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 25, pp. 375-383, 2005.
- [43] J. Y. Y. H. Jinlong Yang, «Recent developments in gelcasting of ceramics,» *Journal of European Ceramic Society*, vol. 31, nº 2011, pp. 2569-2591, 2011.
- [44] V. C. I.H. Arita, «Synthesis and processing of hydroxyapatite ceramic tapes with controlled porosity,» *Journals of materials science. Materials in medicine*, nº 6, pp. 19-23, 1995.
- [45] J. R. Diaz Estrada, Preparación y caracterización de prótesis de hidroxiapatita para globo ocular. Tesis de licenciatura., México, D.F.: UNAM, 1998.
- [46] Voet, Bioquímica, Montevideo, Paraguay: Editorial Médica Panamericana, 2004.
- [47] H. N. Skoog, Principios de análisis instrumental, España: Ed. Mc Graw Hill, 2001.
- [48] M. Yacaman y J. Reyes Gasga, Microscopía electrónica. Una visión al microcosmos, México: Fondo de Cultura Económica, 1995.
- [49] G. Vázquez Nin y O. Echeverría, de *Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas*, México, Fondo de Cultura Económica, 2000.
- [50] B. Cullity, Elements of X-Ray Diffraction, United States of America: Addison-Wesley Publishing Company, 1978.
- [51] [En línea]
<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1221/1.INTRODUCCION.pdf;jsessionid=6EFF88A292614C7AB97BF48967204B9A.tdx2?sequence=2>. [Último acceso: Diciembre 2012].
- [52] J. I. Goldstein, D. E. Newbury, P. Echlin, D. C. Joy, C. Fiori y E. Lifshin, Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis, New York, USA: Plenum Press, 1984.
- [53] J. A. Juhasz y S. M. Best, «Bioactive ceramics: processing, structures and properties,» *Journal of Materials Science*, vol. 47, pp. 610-624, 2012.
- [54] N. Marin Pareja, D. M. Escobar, C. P. Ossa y A. Echavarría, «Síntesis y caracterización de hidroxiapatita microporosa, comparación con un producto comercial,» *Revista Facultad de*

- Ingeniería Universidad de Antioquia*, nº 43, pp. 67-76, 2008.
- [55] G. Duan, C. Zhang, A. Li, X. Yang, L. Lu y X. Wang, «Preparation and characterization of mesoporous zirconia made by using a poly(methyl methacrylate) template,» *Nano express*, nº 3, pp. 118-122, 2008.
- [56] J. Muyonga, C. Cole y K. Duodu, «Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*),» *Food Chemistry*, nº 86, pp. 325-332, 2004.
- [57] S. Bose, M. Roy y A. Bandyopadhyay, «Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. Review,» *Trends in Biotechnology*, vol. 30, nº 10, pp. 546-554, 2012.
- [58] Q. Fu, E. Saiz, M. N. Rahaman y A. P. Tomsia, «Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. Review,» *Materials Science and Engineering C*, vol. 31, pp. 1245-1256, 2011.
- [59] M. Presas Mata, de *Comportamiento mecánico de materiales celulares de carburo de silicio. Tesis doctoral.*, Madrid, 2008.
- [60] M. F. Ashby y D. R. H. Jones, de *Engineering Materials 2. An introduction to microstructures, processing and design*, Great Britain, BH, 2006.
- [61] A. L. Boskey, «Amorphous calcium phosphate: the contention of bone,» *Journal of Dental Research*, vol. 76, nº 8, pp. 1433-1439, 1997.
- [62] J.-C. Hornez, F. Chai, F. Monchau, N. Blanchemain, M. Descamps y H. Hildebrand, «Biological and physico-chemical assessment of hydroxyapatite (HA) with different porosity,» *Biomolecular Engineering*, vol. 24, pp. 505-509, 2007.
- [63] A. Naranjo, M. d. P. Noriega, T. Osswald, A. Roldán-Alzate y J. D. Sierra, *Plastics Testing and Characterization. Industrial applications*, Munich: Hanser Gardner Publications, 2008.