



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES.

“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, ESTRUCTURAL Y PROPIEDADES  
VISCOELÁSTICAS DE HUESO.”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:

ING. SOFÍA JIMÉNEZ ORTEGA.

TUTOR:

DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ.

POSGRADO DE ODONTOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:

DR. OCTAVIO ÁLVAREZ FRAGOSO.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES.

DR. JULIO ALBERTO JUÁREZ ISLAS.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES.

MÉXICO, D.F. MAYO 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Dedicatoria.**

A mi amada familia que siempre he sentido su amor, cariño y comprensión. En especial: A mi mamá que siempre tiene el pensamiento positivo para que logremos nuestros objetivos, a mi papá que siempre está para darnos consejos y apoyo, y a mi hermanito Marco que siempre eres mi ídolo y ejemplo a seguir. A Darío, aún no me explico cómo una persona tan pequeña puede inspirar tanto amor y devoción. Siempre pones lo extra en lo ordinario. A Erika y a mi abuelita porque son dos grandes mujeres y siempre aprendo algo de ustedes.

A mi abuelito y a mi Toby, extrañarlos es lo más difícil que hago todos los días; con ustedes platico cuando estoy sola. Y a Benji y a Lisa que siempre tienen algo que decir con alegría y sentimiento.

Y finalmente, a mí, porque quiero.

## **Agradecimientos.**

Al Dr. Ariel Valladares sin su constante apoyo esto no sería posible.

A los doctores Octavio Álvarez Fregoso, Julio Juárez Islas y Marco Antonio Álvarez Pérez por adoptarme, su apoyo constante e invaluable ayuda.

A los Drs. Lauro Bucio, Pedro Bosch, José Manuel Hernández Alcántara y Miguel Araiza por su tiempo y sus correcciones constructivas en la revisión de esta tesis.

A los encargados de los equipos del laboratorio (RX, AFM y SEM del IIM) M. en C. Adriana Tejeda, Ing. Carlos Flores, Dr. Omar Novelo, respectivamente y a la Dra. Cristina Zorrilla del Instituto de Física por su valiosa ayuda en la caracterización de este tejido.

Gracias a los financiamientos por parte de la UNAM-DGAPA: a los proyectos PAPIIT IN213912 y al IN210815.

Gracias a la beca que me fue otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para mis estudios de maestría.

## **Agradecimientos a título personal.**

A mi mamá, papá y hermanito, por su constante presencia en mi vida. Su ejemplo me hace esforzarme por ser mejor cada día. A Erika, por venir a completar la familia y a Darío, por ser ese pedacito de cielo que no sabía que faltaba en mi vida y sin el cual ya no puedo vivir.

Al Dr. Ariel Valladares por su amistad y preocupación. Por reírnos siempre de las demás personas y los miércoles de donas que no existirían en este changarro de no ser por usted.

A mis amigos: Delia (por los conciertos, libros, películas y todo, todo lo que me aguantas), Ale y a su gordito (por la apapachoterapia, las goyas, las crepas, cafés y dulces), Felipito (aún en la distancia, eres mi hermanito), Gaby (por tu ayuda cuando me la diste), Esteban (por tu ejemplo de paciencia y las historias que siempre estás dispuesto a compartir), Migue (por ser siempre amable y verle el lado bueno a todo), Carlos (por ser agrio como yo), Pelota (por todo lo que me divertí contigo), Lazarito (por siempre detenerte a platicar conmigo). A Chinos y Quique de Chucho por todos los años acumulados y seguimos en el chisme. A Abril (por ser mi amiga desde el primer momento que nos sentamos juntas), Susana (por las historias de tu vida tan maravillosa), Juan Carlos (por tus disculpas cuando me burlo de ti). A Chéquercito, Maurichicho, Piedrita y Nando Cova, tomar clase sin ustedes nunca fue lo mismo. A Ariel, Judith y Michelle por formar nuestra familia puma. Sobre todo, gracias a todos por siempre preguntarme cómo va la tesis.

A mi nueva familia de INCOA, gracias por darme la oportunidad de ser parte de esta gran empresa y seguir con mis tiempos de estudiante.

A mi amada UNAM, aparte de ciencia y tecnología, llenas mi vida de libros, música, danza, teatro, idiomas, museos, etc. A la tesis misma, te odio y sin embargo existes.

## Índice.

	<b>Página.</b>
Objetivo general y particulares.....	7
Introducción.....	8
Capítulo 1. Antecedentes.....	10
1.1 Fundamentos del tejido óseo.....	10
1.2 Fémur.....	11
1.3 Comportamiento mecánico del hueso.....	12
Capítulo 2. Metodología.....	14
2.1 Obtención de muestra.....	14
2.2 Procesamiento para análisis.....	15
2.2.1 Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).....	15
2.2.2 Microscopio de Fuerza Atómica (AFM).....	17
2.2.3 Difracción de rayos X.....	19
2.2.4 Microindentación.....	22
2.2.5 Espectroscopía vibracional (Raman).....	25
Capítulo 3. Resultados.....	28
3.1 Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).....	28
3.2 Microscopio de Fuerza Atómica (AFM).....	33
3.3 Difracción de rayos X.....	38
3.4 Microindentación.....	40
3.5 Espectroscopía vibracional (Raman).....	47

Capítulo 4. Discusión.....	53
Capítulo 5. Conclusiones.....	55
Anexo.....	56
Bibliografía.....	66

## **Objetivo general y particulares.**

### **Objetivo general:**

- ❖ Estudiar las características mecánicas y de composición del tejido óseo de femúr de bovino de modo que se pueda contar con datos confiables que ayuden al diseño de prótesis lo más parecidas en su comportamiento al tejido verdadero.

### **Objetivos particulares:**

- ❖ Analizar antecedentes de datos existentes en la literatura de hueso de cualquier especie (humano, roedor, bovino, etc.)
- ❖ Caracterizar la morfología ósea.
  - Obtener una muestra de tejido óseo de bovino.
  - Realizar prueba con Microscopio Electrónico de Barrido.
  - Examinar con Microscopio de Fuerza Atómica.
  - Analizar a través de Difracción de Rayos X.
  - Efectuar ensayos de dureza para determinar la viscoelasticidad del tejido óseo.

## **Introducción.**

### *Hueso.*

El tejido óseo es un biomaterial compuesto de una fase orgánica y una inorgánica. La orgánica está compuesta por diversas proteínas tales como el colágeno tipo 1, la osteocalcina, la osteonectina y la osteopontina; mientras que la hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) y en menor medida el fosfato de calcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), además de otros elementos minoritarios como magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) o sodio ( $\text{Na}^+$ ) constituyen la fase inorgánica, también llamada fase mineral. La porción mineral está relacionada con el grado de mineralización pues confiere rigidez a estos tejidos y es una propiedad indispensable en el desarrollo de las funciones biomecánicas<sup>[1]</sup>.

Estructuralmente, los huesos se encuentran conformados por un arreglo trabecular (o esponjoso) el cual se halla cubierto por un tejido cortical (o compacto)<sup>[2]</sup>. En el cuerpo humano se encuentra un 80% de cortical y 20% de esponjoso<sup>[3,4]</sup>. La diferencia estructural entre éstos se debe a la densidad causada por la cantidad y distribución de trabéculas, las cuales están dirigidas según los ejes de los esfuerzos máximos que por tracción y compresión soporta el tejido óseo y se disponen de tal forma que se presenta la máxima resistencia frente a estas sollicitaciones<sup>[5]</sup>, de igual modo, proveen al hueso esponjoso (30-90% de porosidad) de la función de distribuir las cargas mecánicas que le sean aplicadas mientras que la parte cortical (5-10% de porosidad) se encarga del soporte y protección del hueso, dado que cuenta con mayor densidad que el trabecular<sup>[6-9]</sup>.

### *Viscoelasticidad.*

Al contrario de las estructuras elásticas, algunos materiales muestran un comportamiento esfuerzo- deformación característico que no es estrictamente lineal; a estos materiales se les llama viscoelásticos. Estas estructuras tienen propiedades no lineales o viscosas en combinación con propiedades lineales elásticas. La combinación de estas propiedades da como resultado que la magnitud del esfuerzo depende del rango de carga, o de la rapidez con que se aplica ésta. Lo anterior se debe al contenido de agua en la estructura y a su compleja composición. <sup>[10-12]</sup> Casi todos los materiales biológicos, como tendones y ligamentos, muestran cierto nivel de viscoelasticidad. Por ejemplo, al estudiar la mecánica de la inserción de un ligamento en el hueso, si lo cargamos de una forma muy rápida, el ligamento se rompe, mientras que si lo cargamos más despacio se produce una fractura por avulsión del hueso.

Los tejidos biológicos son conocidos por tener relaciones esfuerzo-deformación no lineales, ser fuertemente anisotrópicos y tener características viscoelásticas significativas.

La viscoelasticidad presente en tejidos biológicos reduce la falla por fatiga. Lo anterior debido a la acumulación de daño causado por la fatiga, la cual es menor en una respuesta viscoelástica que en una respuesta puramente elástica después de numerosos ciclos de carga y descarga.

La importancia de este trabajo radica en que la morfología y la caracterización del hueso (en este caso, de bovino) son propiedades que hay que conocer por la importancia que tienen en el desarrollo de prótesis y sus materiales. Éstos deben tener propiedades parecidas al tejido óseo así como la biocompatibilidad, y la viscoelasticidad para que se asemejen lo más posible a este tejido.

## Capítulo 1. Antecedentes.

### 1.1 Fundamentos del tejido óseo.

Al conjunto de huesos unidos entre sí se le conoce como sistema óseo o esqueleto. Éste es el encargado de proteger y almacenar los órganos internos y de proveer de movimiento y soporte al cuerpo.

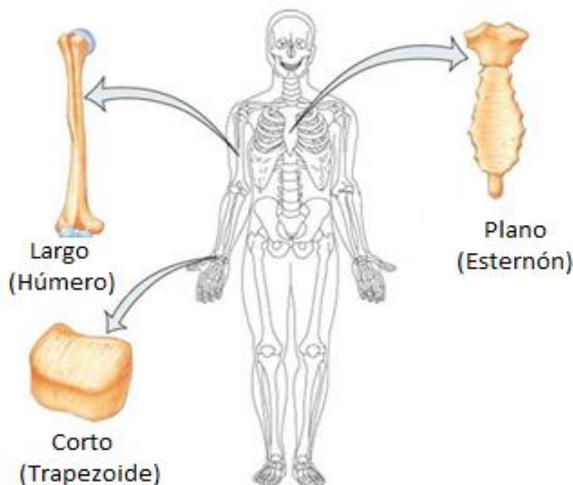
Existen dos tipos de tejido óseo: cortical (o compacto) y esponjoso (o trabecular). El primero forma la capa exterior de los huesos y tiene una estructura densa; el segundo se encuentra principalmente en los huesos cortos y en los extremos de los huesos largos <sup>[13]</sup>. El nombre de trabécula se deriva de su arquitectura formada por distribuciones cilíndricas que son estructuras óseas con forma tubular y de placas comunicadas entre sí.

Los huesos se presentan en tres formas principales:

*Huesos largos:* Se caracterizan por tener diáfisis estrechas y epífisis anchas para repartir mejor las cargas. La estructura interna de las epífisis es principalmente de hueso esponjoso con una corteza periférica de hueso compacto, mientras que la diáfisis tiene una geometría cilíndrica cubierta de tejido cortical ocupada por médula ósea.

*Huesos cortos:* Tienen forma variable, sus 3 medidas son semejantes lo que les confiere gran estabilidad y poca movilidad. El tejido esponjoso forma su mayor parte, recubierto por una fina capa de tejido compacto.

*Huesos planos:* Su espesor es reducido, predomina la longitud y el ancho. Constituyen las paredes de las cavidades craneana, nasales, orbitarias y pelviana. La distribución en el hueso plano es la misma que en el corto.



## Figura 1. Formas principales de los huesos <sup>[14]</sup>.

Dado que en este trabajo el hueso estudiado es el fémur, a continuación se detallarán sus características más representativas.

### 1.2 Fémur.

El fémur es un hueso largo, voluminoso y resistente. Es el más largo y pesado del cuerpo. Más del 7% de las fracturas por esfuerzo ocurren en él <sup>[15]</sup>.

Su epífisis superior presenta la cabeza femoral, de forma esférica compuesta principalmente por hueso esponjoso, orientado según las líneas de fuerza y de presión sufridas por el hueso. El cuello es un estrechamiento que une la cabeza con el resto del hueso, desempeña la acción de soporte y transmisión entre el tronco y el miembro inferior.

La *diáfisis o cuerpo* muy largo y resistente, está formada por un cilindro de hueso compacto que rodea una cavidad medular.

Su extremidad inferior participa en la articulación de la rodilla. Tiene forma abultada y se curva de adelante hacia atrás.

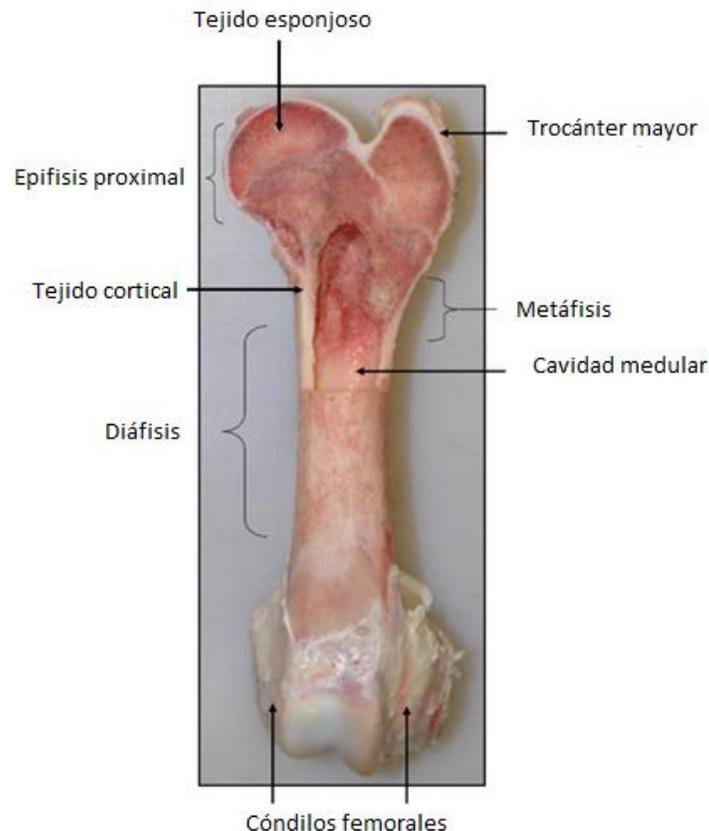
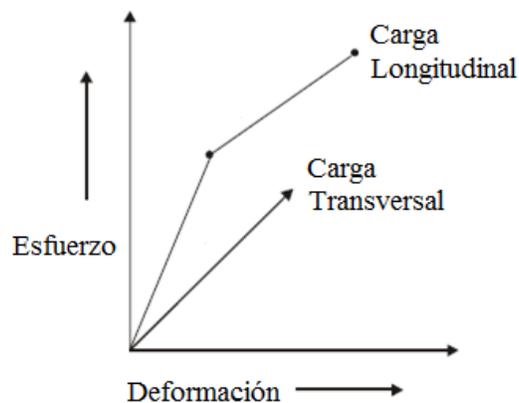


Figura 2. Fémur de bovino donde se aprecian sus diferentes partes. <sup>[16]</sup>

### 1.3 Comportamiento mecánico del hueso.

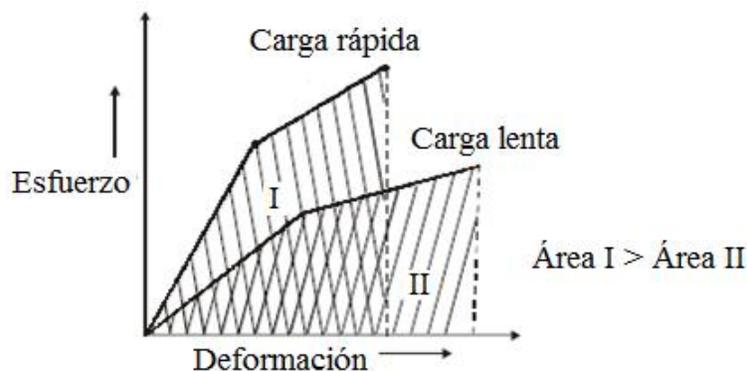
El hueso es un tejido vivo capaz de alterar su forma y comportamiento mecánico, cambiando su estructura para soportar las fuerzas externas a las que es sometido.

El tejido óseo se considera anisotrópico <sup>[17]</sup> pues su respuesta mecánica depende de la dirección en que se aplique la carga. Lo anterior debido a que las partículas minerales que forman este tejido tienen diferentes formas, es por esto que el hueso presenta mayor resistencia a la fractura y un mayor módulo de elasticidad en sentido longitudinal que en la dirección transversal como se observa en la Figura 3.



**Figura 3. Gráfica que muestra el comportamiento anisotrópico del hueso.** <sup>[18]</sup>

En la gráfica de la Figura 4, se observa que al aumentar la rapidez con que se aplica la carga, el módulo de elasticidad también se incrementa, pues éste se representa por la pendiente de la región elástica la cual es mayor aplicando rápidamente la carga. <sup>[19]</sup>



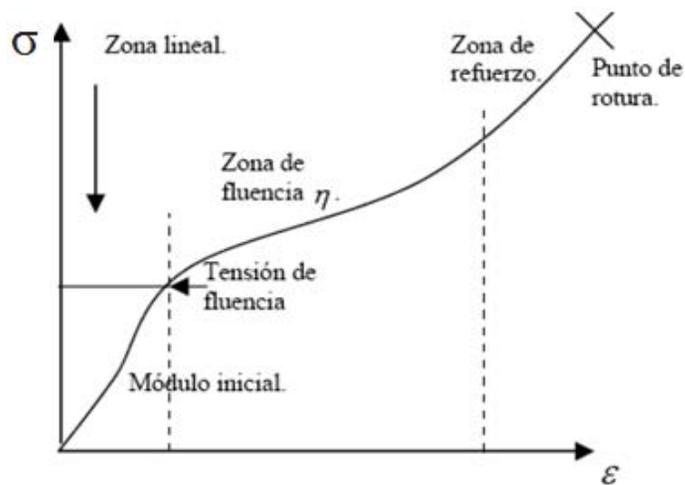
**Figura 4. Gráfica esfuerzo- deformación dependiendo de la rapidez con que se aplique la carga.** <sup>[18]</sup>

Debido a lo anterior, se considera que el hueso es un material viscoelástico. Casi todos los materiales biológicos están hechos a base de biopolímeros, los cuales se caracterizan por presentar este tipo de comportamiento mecánico.<sup>[20-27]</sup> El hueso está constituido en su mayoría por el mineral hidroxapatita y fibras de colágeno y son estas últimas las que le confieren la viscoelasticidad <sup>[28]</sup>.

El grado de deformación que experimentan estos materiales depende de la aplicación de las cargas, la reorientación de los componentes orgánicos y la migración del agua debido al esfuerzo al que es sometido <sup>[29-32]</sup>.

A continuación se muestra el diagrama esfuerzo- deformación de un tejido viscoelástico como el tejido óseo.

En la parte inicial de la Figura 5, conocida como región elástica, el esfuerzo es proporcional a la deformación. Continúa una región donde ocurre el deslizamiento del material debido a la rotura de sus enlaces prioritariamente secundarios que permite que la estructura de la red se extienda fácilmente, a esto se le llama tensión de fluencia. Cuando la deformación llega al límite, y no se pueden producir más deslizamientos entre cadenas, se alcanza la zona de refuerzo. En esta región, el alargamiento del material aumenta continuamente y se mantiene hasta el punto de rotura.<sup>[33]</sup>

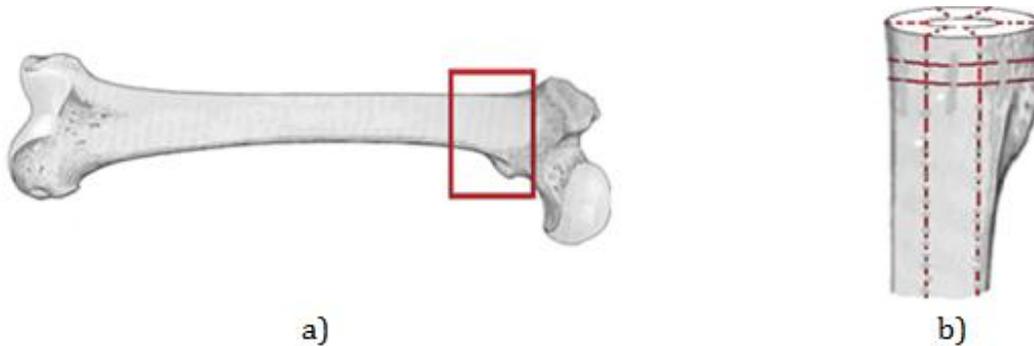


**Figura 5. Diagrama esfuerzo- deformación de materiales viscoelásticos** <sup>[34]</sup>.

## Capítulo 2. Metodología.

### 2.1 Obtención de muestra.

Para realizar el presente estudio, se extraen muestras de fémur fresco de bovino. Este tejido es elegido debido a la facilidad con que puede ser adquirido y a que sus características morfológicas y mecánicas son similares a las del tejido óseo humano. Este tejido es seccionado longitudinalmente (ver Figura 6a y 6b) con una cortadora con disco de diamante (BUEHLER, ISOMET 1000) con lo que se obtiene un corte fino de tal modo que la muestra queda sin astillas y sin la necesidad de ser pulida, como se indica en la norma ASTM E384-99 <sup>[35]</sup>. De igual modo, las indicaciones para las dimensiones de las muestras y cómo cortarlas se siguieron de la anterior norma.



**Figura 6. (a) Zona de experimentación seleccionada (tejido cortical y esponjoso).  
(b) Cortes realizados.**<sup>[36]</sup>

Una vez que se tiene el fémur seccionado, las partes se limpian con agua desionizada y un cepillo de dientes suave para remover la médula ósea, la cual es un tejido que se encuentra dentro de los huesos y podría afectar las pruebas debido a que al enfriarse este tejido se vuelve seboso.

Para las pruebas de microindentación y de espectroscopía Raman, las muestras se rehidratan sumergiéndolas en agua por un lapso de 3 horas hasta que adquieren una apariencia de hueso fresco, esto para conseguir características parecidas a las que tendría el tejido *in vivo*; para las pruebas con microscopio electrónico de barrido, de fuerza atómica y difracción de rayos X, las muestras se dejan secar.

Para la prueba de difracción de rayos X, la muestra es hecha polvo. Para el resto de las pruebas, las muestras quedan con unas medidas de 25 mm de largo por 3 mm de ancho para la microindentación a modo de tener ambos tipos de hueso en la muestra; para el

microscopio electrónico de barrido y la espectroscopía Raman, las muestras son de 6 mm de largo por 3 mm de ancho y para el microscopio de fuerza atómica, 3 mm de largo por 3 mm de ancho.

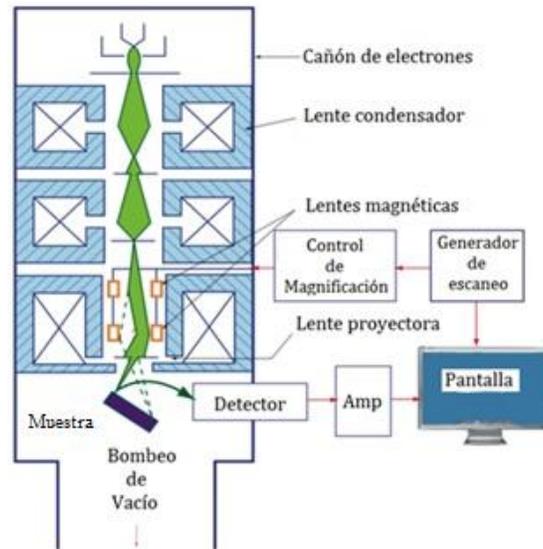
## **2.2 Procesamiento para análisis.**

Para realizar la caracterización de un material como el hueso, es importante el estudio de sus características morfológicas como lo son el tamaño de partícula, el tamaño de grano y la rugosidad, entre otras. Para tal caracterización se usan técnicas como microscopía electrónica de barrido, microscopio de fuerza atómica, difracción de rayos X y últimamente, análisis vibracional Raman.

### **2.2.1 Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).**

El microscopio electrónico de barrido (SEM por sus siglas en inglés) es una herramienta poderosa para caracterizar la estructura superficial del hueso. Puede ser utilizado a escala macroscópica, con el fin de observar la distribución de las trabéculas<sup>[37]</sup>, debido a que provee imágenes ricas en detalles visuales y certeza en la medición del tamaño de partícula. La microscopía electrónica es una herramienta precisa que provee imágenes de microestructuras, y que permite medir propiedades físicas, así como determinar la composición elemental local del material.<sup>[38]</sup>

Un microscopio electrónico de barrido es usado para obtener imágenes de la superficie de materiales con la ayuda de señales derivadas de la interacción entre los electrones y la muestra. Sus ventajas radican en su gran poder de resolución, la posibilidad de observación directa de la muestra, presenta una fácil operación y un espacio amplio para experimentar con la pieza.<sup>[39]</sup> Sin embargo, las muestras se observan a vacío y reciben un haz de electrones que puede alterar la morfología de la muestra, sobre todo si es una muestra conductora de electrones.



**Figura 7. Esquema del funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido.**<sup>[40]</sup>

Un microscopio electrónico utiliza como elementos principales un inyector o cañón electrónico, dos lentes condensadoras que permiten variar la iluminación de la muestra, cuatro o cinco lentes proyectores y un sistema de vacío. Así, este tipo de microscopios utiliza una serie de lentes magnéticas para enfocar hacia una muestra, que se encuentra en vacío, un haz electrónico que ha sido acelerado por un alto potencial.

Las lentes generalmente son una lente condensadora para el control del haz electrónico y, para el aumento de la imagen, una o dos lentes que actúan como proyector y objetivo. La distribución de intensidades electrónicas se traslada a una pantalla fluorescente con un sistema de lentes de 3 o 4 etapas.<sup>[41]</sup>



a)



b)

**Figura 8. a) Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-7600F. b) Muestras secas de hueso.**

### **2.2.2 Microscopio de Fuerza Atómica (AFM).**

EL microscopio de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés) es un instrumento usado para obtener imágenes topológicas de la superficie de la muestra con una resolución del orden de nanómetros.<sup>[42]</sup>

Comparado con SEM, el AFM tiene varias ventajas<sup>[43,44]</sup>:

- Tiene la habilidad de tomar imágenes en un ambiente en aire o solución con poca o ninguna preparación o fijación.

- Tiene la capacidad de cuantificar directamente las características de las imágenes, tales como, alturas y profundidades estructurales, dureza o elasticidad de la superficie,
- Mide la interacción en el tejido por la punta utilizada.
- Una razón muy importante para utilizar AFM en investigaciones de materiales biológicos es el hecho que las muestras de interés pueden probarse y fotografiarse en condiciones muy similares a su estado natural, i.e. en solución líquida o salina.

El modo de operación de este tipo de microscopio puede ser de distintas formas:

*Fuerza repulsiva:* También llamada fuerza de contacto existente entre una aguja en forma de pirámide y una muestra del material. La fuerza es detectada por la medida de la desviación de la punta, esta fuerza puede ser del orden de 1 a 10 eV/Å o  $10^{-9}$  a  $10^{-8}$  N <sup>[45]</sup>. Este modo de operación se realiza induciendo una resonancia mecánica o vibración en la aguja y ésta detecta un cambio en la frecuencia de resonancia debido a las fuerzas interatómicas entre ella y la pieza. Esta señal es usada después en el punto de retroalimentación para mantener un contacto punta- pieza constante. <sup>[55]</sup>

*Fuerza atractiva:* No provee resolución atómica, pero se obtiene información importante acerca de la superficie de la muestra analizada. <sup>[45]</sup> La punta nunca toca la muestra, simplemente vibra cerca de la superficie. El espacio entre la muestra y la punta es de aproximadamente entre 10 y 100 Angstroms. <sup>[47]</sup>

Existe un tercer modo de contacto llamado intermitente. Mientras la punta barre la superficie, ésta toca a la muestra y se aleja consecutivamente. Este modo es más efectivo para materiales que presentan una topografía variada. <sup>[47]</sup>

Los elementos que forman parte del microscopio de fuerza atómica son: un rastreador (scanner) piezoeléctrico, un posicionador tridimensional (ménsula), una aguja con forma de pirámide hecha de nitruro de silicio de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de largo, un retroalimentador electrónico (fotodiodo), un sistema de vibración aislada y una computadora de control. <sup>[46]</sup>

Este microscopio se opera montando la muestra de un material en un tubo piezoeléctrico. A continuación es recorrida por una aguja de diamante o nitruro de silicio que se encuentra montada en un soporte. Un haz de láser es deflectado por un espejo montado en la parte trasera del soporte y este haz es registrado por un detector que es capaz de registrar desviaciones menores a 0.1 nm. <sup>[45]</sup>

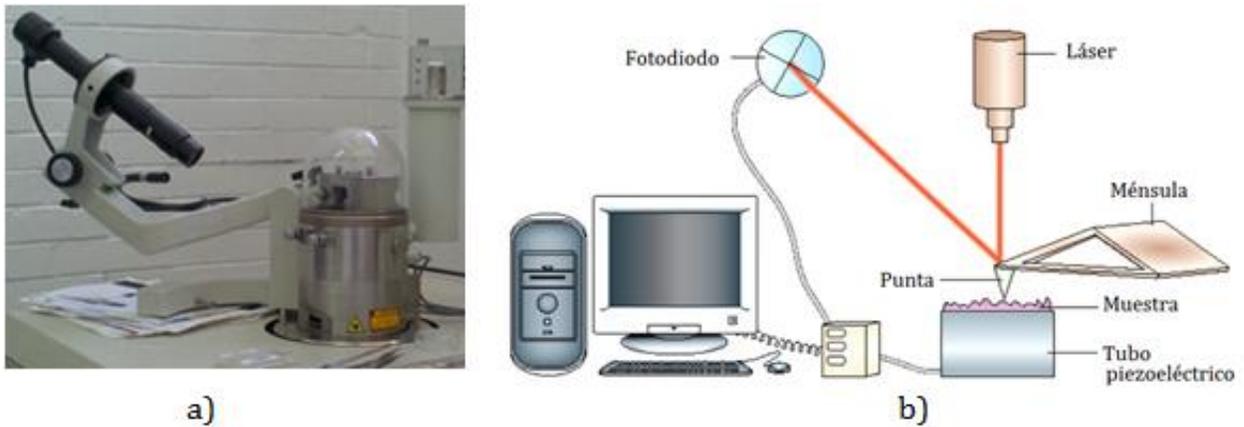


Figura 9. a) Microscopio de Fuerza Atómica JSPM-4210. b) Esquema de un AFM.<sup>[49]</sup>

### 2.2.3. Difracción de rayos X.

La difracción de rayos X es un método bien conocido para analizar materiales. Este método es usado para medir propiedades tales como parámetros de red, estructura cristalina, orientación preferencial, esfuerzo residual, y figuras de polos.<sup>[47]</sup>

Una fase cristalina dada siempre produce un patrón de difracción característico, esté en estado puro o como constituyente de una mezcla. Este hecho es la base para el uso de la difracción como método de análisis químico.<sup>[49]</sup>

Los rayos X son radiación electromagnética con una longitud de onda de  $\approx 1\text{Å}$  ( $10^{-10}$  m) que se producen en tubos al vacío cuando electrones a alta velocidad colisionan contra una capa de metal (ánodo); los electrones, que son acelerados por una diferencia de potencial de 30 KV, chocan y desplazan a otros a un nivel más alto de energía permitiendo que el átomo se ionice, de esta forma, los electrones al regresar a un lugar vacante en un nivel de energía menor dan como resultado la emisión de rayos X.<sup>[49]</sup>

Dependiendo del material que se utilice para el ánodo y cátodo se produce radiación con diferentes longitudes de onda; con ondas cortas la radiación es dura y con ondas largas es blanda. Si la radiación deseada posee una longitud de onda determinada se denomina monocromática y si la radiación tiene diferentes longitudes de onda se le denomina policromática.<sup>[49]</sup>

La radiación monocromática, que se utiliza en un difractor de rayos X para determinar la estructura cristalina de un material, se obtiene a través de un filtro que sólo deja pasar la radiación con una longitud de onda deseada. La Tabla 1.1 indica los materiales y filtros.

Placa	$K\alpha_1$	$K\alpha_2$	$K\alpha^*_1$	Filtro
Cr	2.2896	2.2935	2.2909	V
Fe	1.9360	1.9399	1.9373	Mn
Cu	1.5405	1.5443	1.5418	Ni
Mo	0.7093	0.7135	0.7170	Nb

**Tabla 1. Metales y filtros para producir radiación monocromática de rayos X.**

Si los rayos X inciden sobre un cristal, éstos son dispersados por los átomos del material.

Los rayos X dispersados tienen la misma longitud de onda que los incidentes, porque la radiación dispersada es debida a la aceleración y desaceleración de electrones puestos en movimiento por los rayos X incidentes, entonces la difracción es la relación existente entre una o más ondas, tomando en cuenta su fase, cuando interactúan los rayos X con los átomos, produciendo un haz compuesto de un número grande de rayos dispersados reforzándose unos a otros.

En ciertas direcciones, los rayos están en fase originando una difracción, o interferencia constructiva. Cuando los rayos no están en fase, ocurre una interferencia destructiva y no

existe difracción. La interferencia constructiva está regida por la longitud de onda  $\lambda$  de la radiación, la separación interplanar  $d$  y un ángulo  $\theta$  (dirección del rayo incidente).<sup>[51]</sup>

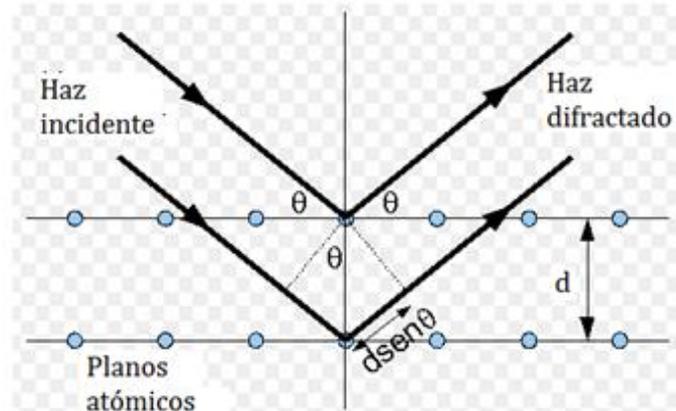
Para lo anterior, se utiliza la *ley de Bragg*. William Bragg observó que algunos rayos X incidentes a los planos (o capas que actúan como un espejo semitransparente) se reflejaban con un ángulo de reflexión igual al de incidencia, pero el resto eran transmitidos a planos subsiguientes.<sup>[51]</sup>

Bragg tomó dos hechos geométricos para su trabajo:

1. El haz incidente, es normal al plano de reflexión, y el haz difractado es siempre coplanar.
2. El ángulo entre el haz difractado y el haz transmitido es siempre  $2\theta$ . Esto se conoce como ángulo de difracción.



a)



b)

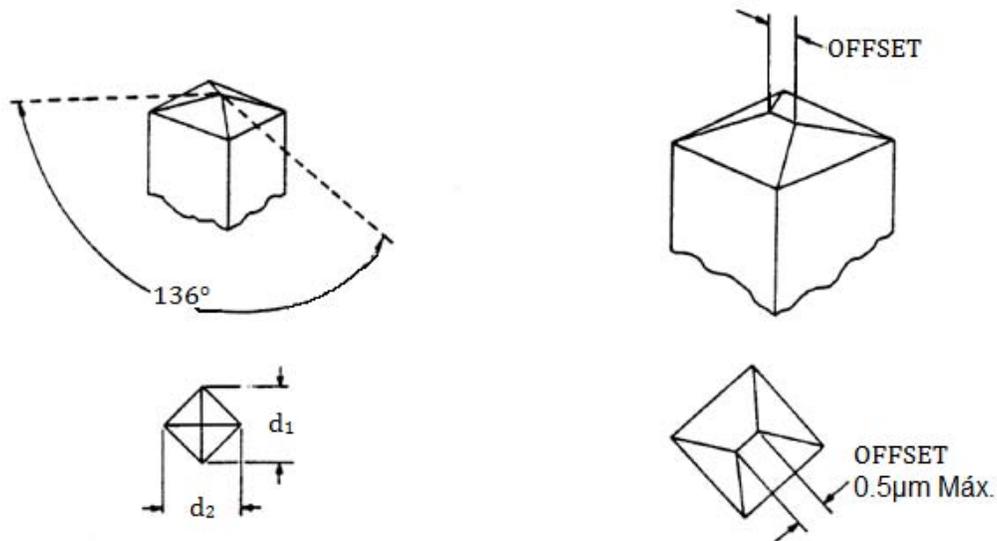
**Figura 10. a) Equipo Bruker AXS D8 Advance. b) Esquema de la ley de Bragg.**<sup>[62]</sup>

La *ley de Bragg* se escribe  $2d \sin \theta = n \lambda$ , donde  $d$  es el espacio interplanar,  $\theta$  el ángulo de Bragg,  $\lambda$  la longitud de onda y  $n$  el orden de reflexión que siempre es un número entero.

La ley de Bragg se cumple cuando los rayos reflejados están en fase y ocurre una interferencia constructiva. La intensidad de los haces difractados depende de los ángulos a los cuales la reflexión ocurre, del tiempo de exposición y éste a su vez depende de elementos que absorban los rayos X. El tamaño preferible de un polvo para estudio es de 1 a  $10\ \mu\text{m}$ .<sup>[51]</sup>

#### 2.2.4. Microindentación.

El microdurómetro Vickers es un aparato con el cual se realiza una prueba de dureza usando una máquina calibrada que consta de un indentador de diamante de geometría específica que aplica una carga en la superficie del material que está siendo evaluado. Las diagonales de la indentación son medidas con un microscopio de luz después de que la carga ha sido removida.<sup>[35]</sup>



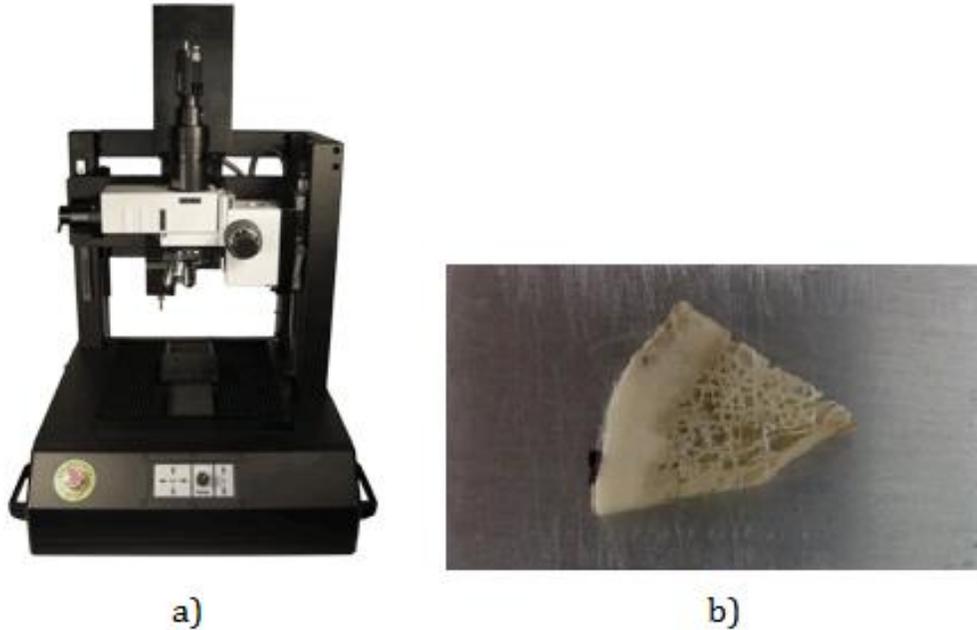
### **Figura 11. Geometría del indentador Vickers.** <sup>[35]</sup>

El indentador Vickers es un diamante altamente pulido, afilado, con forma piramidal de base cuadrada. Los ángulos de sus caras son de  $136^{\circ}0'$ . Las cuatro caras del penetrador Vickers deben tener la misma inclinación que el eje del penetrador (con una tolerancia de  $\pm 30'$ ). La línea de unión entre caras opuestas (OFFSET) no será superior a las  $0.5\mu\text{m}$  de longitud. <sup>[36]</sup>

La muestra se fija con pegamento (en este caso, se utilizó un adhesivo de Cianoacrilato) a una base de aluminio para conferirle la estabilidad y altura necesarias para realizar la prueba de microindentación, la cual es empleada para obtener la dureza y módulo de elasticidad del hueso, así como de otros tejidos duros como la dentina y el esmalte dental. <sup>[63]</sup> En esta prueba, el desplazamiento del penetrador se medirá de forma continua en función de la fuerza aplicada, durante los ciclos de carga y descarga.

Se coloca la muestra en el microdurómetro Vickers (Micro Photonics Inc., NANOVEA). Los parámetros de ensayo son: carga aplicada 0.5 N, velocidad de acercamiento  $10\mu\text{m}/\text{min}$ , Carga de contacto de 15 N/min, tiempo de Creep de 5 s, tasa de carga y descarga de 1, 5, 10, 50 y  $100\text{ N}/\text{min}$ , respectivamente. Se utilizan 3 muestras que cuenten con los dos tipos de tejido óseo y se le realizan 10 pruebas a cada una, de los cuales se obtiene el módulo de elasticidad [GPa], la dureza de acuerdo con la escala Vickers [HV], y la profundidad máxima [ $\mu\text{m}$ ] que alcanzó el indentador. En la Tabla 3 de la sección de Resultados se presenta el valor promedio de cada uno de estos a su respectiva velocidad.

Se sigue una trayectoria lineal de tejido cortical a esponjoso (Figura 7b) para observar cómo se modifica el módulo de elasticidad y la profundidad de la huella conforme se cambia de tejido.



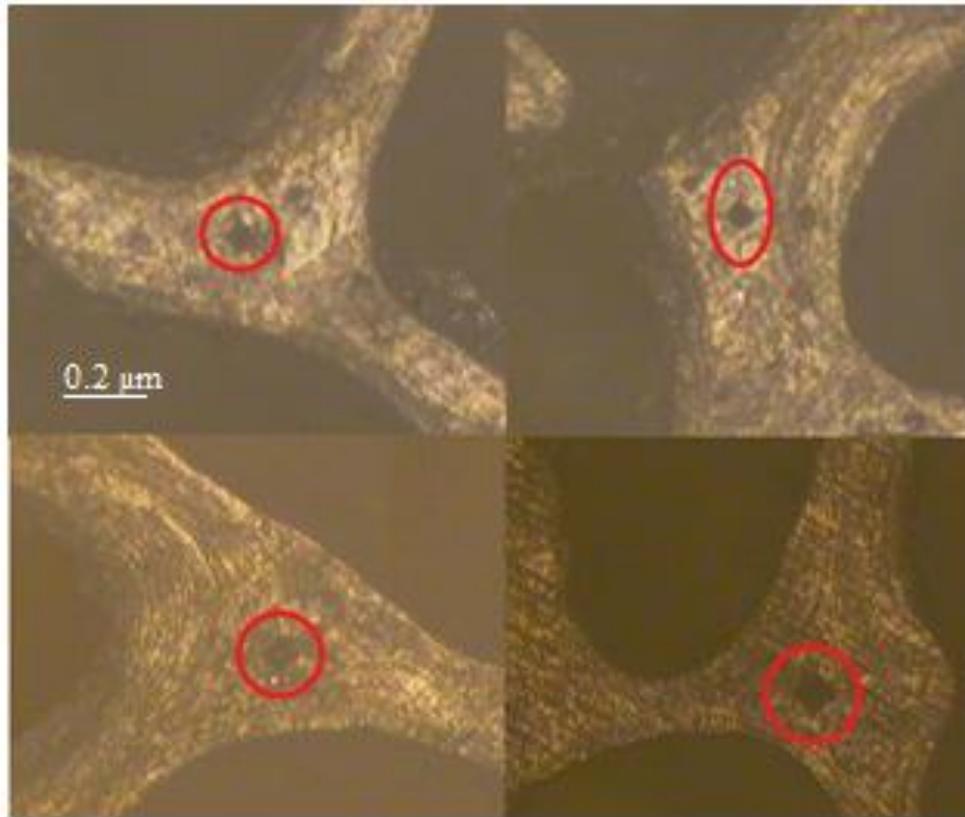
**Figura 12. a) Microindentador Vickers NANOVEA b) Muestra de hueso sobre base de aluminio.**

En el caso del hueso cortical, observando con el microscopio óptico, se mide el largo de la superficie que se va a utilizar, buscando que sea lo más homogénea posible, esto porque cualquier defecto presente afecta la perforación del material. Se hace una primera prueba para tomar la medida de la huella dejada por el microdurómetro y se calcula el área a utilizar considerando que se debe dejar una distancia mayor a cuatro veces la distancia del centro de una huella a la siguiente, lo anterior de acuerdo con la norma ASTM E384-99.

Para este tipo de hueso, el promedio de las diagonales de la primera huella fue de  $0.04 \mu\text{m}$  por lo que se dejó un espacio de  $0.5 \mu\text{m}$  entre cada huella. Al terminar de realizar las pruebas, se regresa al microscopio óptico para revisar que las diagonales de las huellas dejadas por el indentador no tengan una diferencia mayor del 5% en su medida y que las 4 esquinas estén claramente marcadas.

Para el tejido trabecular, se debe buscar uno a uno los puntos donde se quiere realizar cada prueba y apuntar las coordenadas exactas debido a que el espacio entre trabéculas es muy grande y al momento de hacer la prueba, el indentador podría no tocar la superficie o hacerlo de modo parcial. En la Figura 13 se observan algunos ejemplos de trabéculas indentadas. De acuerdo con la norma mencionada anteriormente, las huellas dejadas por el microindentador no deben de estar en los bordes de las trabéculas ni deben presentar una deformación considerable por lo que antes de retirar la muestra al terminar las pruebas,

usando el microscopio óptico de luz se revisa cada impresión dejada por el microindentador.



**Figura 13. Muestra de trabéculas indentadas vistas con el microscopio óptico con un aumento de 50x.**

### **2.2.5. Espectroscopía vibracional (Raman).**

La espectroscopía vibracional (Raman) permite caracterizar las diferentes estructuras químicas que aparecen en el tejido óseo, gracias a que las diferentes bandas de los espectros responden con diferentes modos de vibración a las distintas moléculas que componen este tejido. <sup>[62]</sup>

La espectroscopia Raman es una técnica muy aplicable para analizar tejidos biológicos debido a que: <sup>[55,56]</sup>

- La preparación que necesita el tejido es mínima, la medición es no destructiva y se puede analizar exitosamente cantidades mínimas de un material.

- Provee información a nivel molecular, permitiendo la investigación de grupos funcionales, tipos de enlaces y formaciones moleculares.
- No sufre interferencia por agua y ofrece una resolución a nivel micro espacial.



**Figura 14. Equipo para Espectroscopía Raman Thermo SCIENTIFIC DXR**

En el espectro Raman se obtienen las frecuencias de vibración y las intensidades de los picos. El número de los picos está relacionado con el número de átomos en la molécula y su simetría, de esta manera cuanto más átomos haya o menor sea la simetría, mayor será el número de picos. Por otro lado, la frecuencia de vibración es mayor cuanto mayor sea la rigidez de los enlaces o menor sea la masa de los átomos involucrados. Sin embargo, las intensidades Raman dependen de la naturaleza de los enlaces, aumentando con la convalecencia de éstos y de su simetría. <sup>[57]</sup>

Los espectrómetros Raman que se utilizan en la actualidad son instrumentos dispersivos o de Transformada de Fourier (FT) <sup>[58]</sup>. Los dispositivos principales que componen los espectrómetros Raman dispersivos y de Transformada de Fourier son: el monocromador y el interferómetro, respectivamente.

La instrumentación Raman debe ser capaz de eliminar la dispersión Rayleigh indeseada, mientras se analiza la débil dispersión Raman.

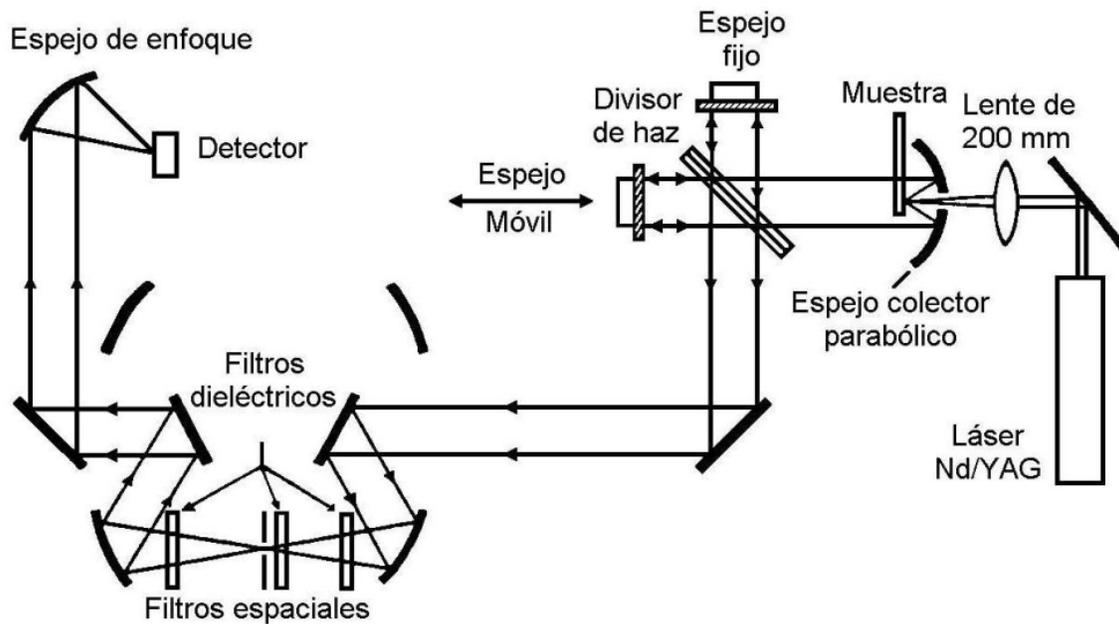
Debido al requerimiento de alta intensidad de la fuente monocromática, impuesta por la baja eficiencia del efecto Raman (típicamente 1 en  $10^7$  fotones son dispersados por el proceso Raman), la fuente de excitación es un láser de gas, Argón y Kriptón, que pueden

dar varios vatios de potencia en ciertas frecuencias discretas del espectro visible. La gran mayoría de láseres emiten también algo de luz a frecuencias no deseadas. Los sistemas FT emplean emisiones láser cercanas al infrarrojo, usualmente Nd:Yag con láser de 1064nm, los sistemas de dispersión de rango corto usualmente emplean emisiones de láser Ion Ar-He o He-Ne. La luz láser se suele limpiar, de las frecuencias no deseadas mediante filtros interferenciales o pequeños monocromadores de prisma. <sup>[57]</sup>

El enfoque óptico depende en mucho de la geometría particular y consiste regularmente del enfoque y lentes apropiados para la longitud de onda del láser. En los sistemas dispersos, un lente cilíndrico es comúnmente colocado para enfocar el haz del láser en la superficie de la muestra, es decir, que la máxima intensidad de la señal pasa a través de la apertura rectangular monocromática y también como una ayuda para evitar el efecto de calentamiento láser ya que puede producir cambios en la muestra. La colección óptica también está compuesta por una configuración de lentes que optimizan la detección de señales. La luz dispersada por la parte más iluminada de la muestra, se enfoca, con una lente de colección sobre la rendija de entrada del espectrómetro, que es donde se analiza la luz y se obtiene el espectro Raman. <sup>[57]</sup>

El procesador de señales puede definirse como un arreglo óptico que permite construir una frecuencia, energía o descomposición de señales. En caso de los sistemas FT, el procesador de señales consiste de un interferómetro Michelson y un procesador FT, que en el caso de los sistemas dispersos, el procesador de señales es un monocromador. De estas maneras los monocromadores de Raman, separan la luz dispersa según su frecuencia por medio de redes de difracción que son espejos con un rayado de más de mil rayas por milímetro, que separan la luz en sus colores constituyentes, la resolución de espectrómetro viene dada por el número de redes, el número de rayas en las redes, la distancia focal y la apertura de las rendijas.

Tal monocromador necesita ser doble o triple para suprimir la elasticidad del rayo láser dispersado. Con esto la segunda y tercera red, recombinan los colores separados por la primera dejando pasar sólo una banda de frecuencias Stokes y no Rayleigh. La luz Raman separada espacialmente en frecuencias se transforma en señales eléctricas, en detectores muy sensibles, normalmente enfriados para reducir el ruido. El procesador de señales alcanza al detector. El detector Raman es diferente para el FT y los sistemas de dispersión, debido al diferente rango de longitud de onda en la que trabajan. <sup>[57]</sup>



**Figura 15. Esquema de espectrómetro Raman.**

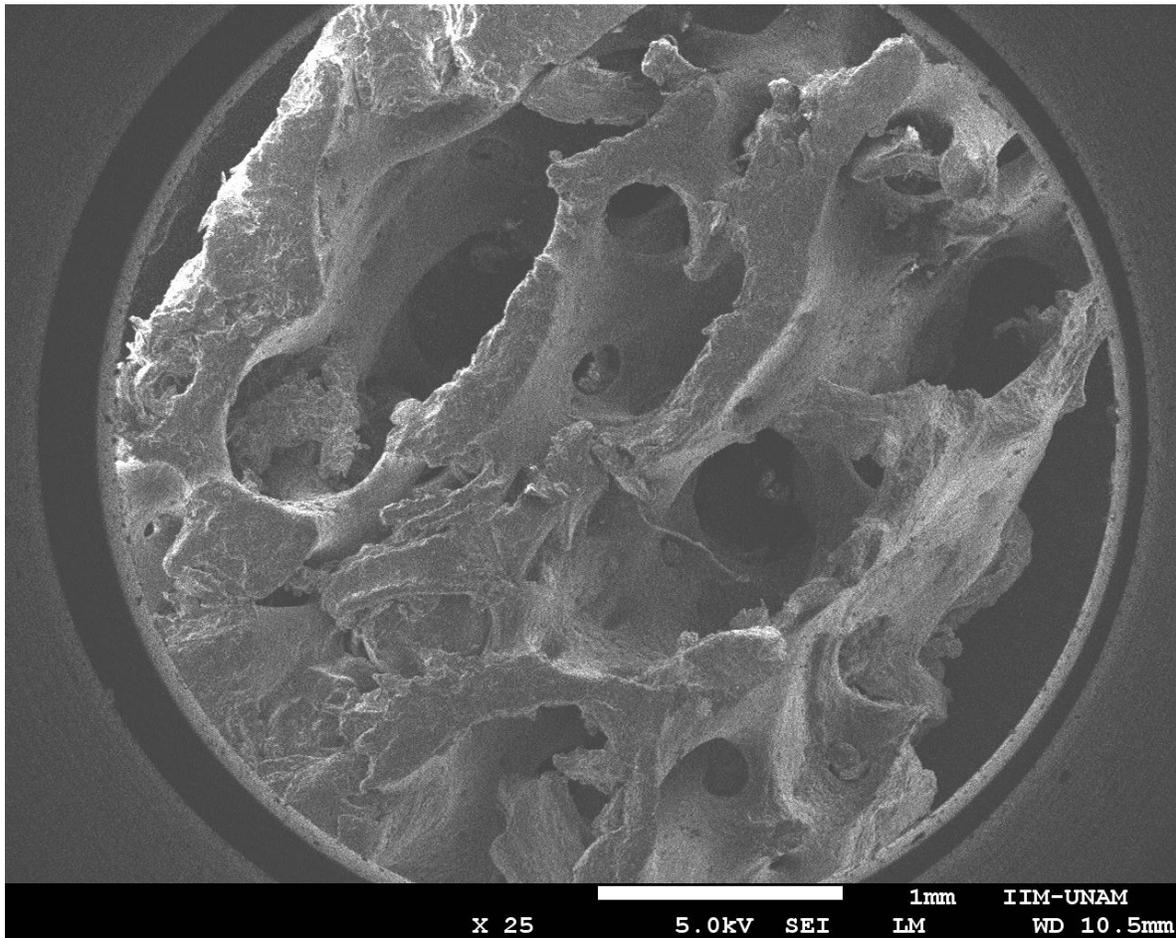
### **Capítulo 3. Resultados.**

#### **3.1 Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).**

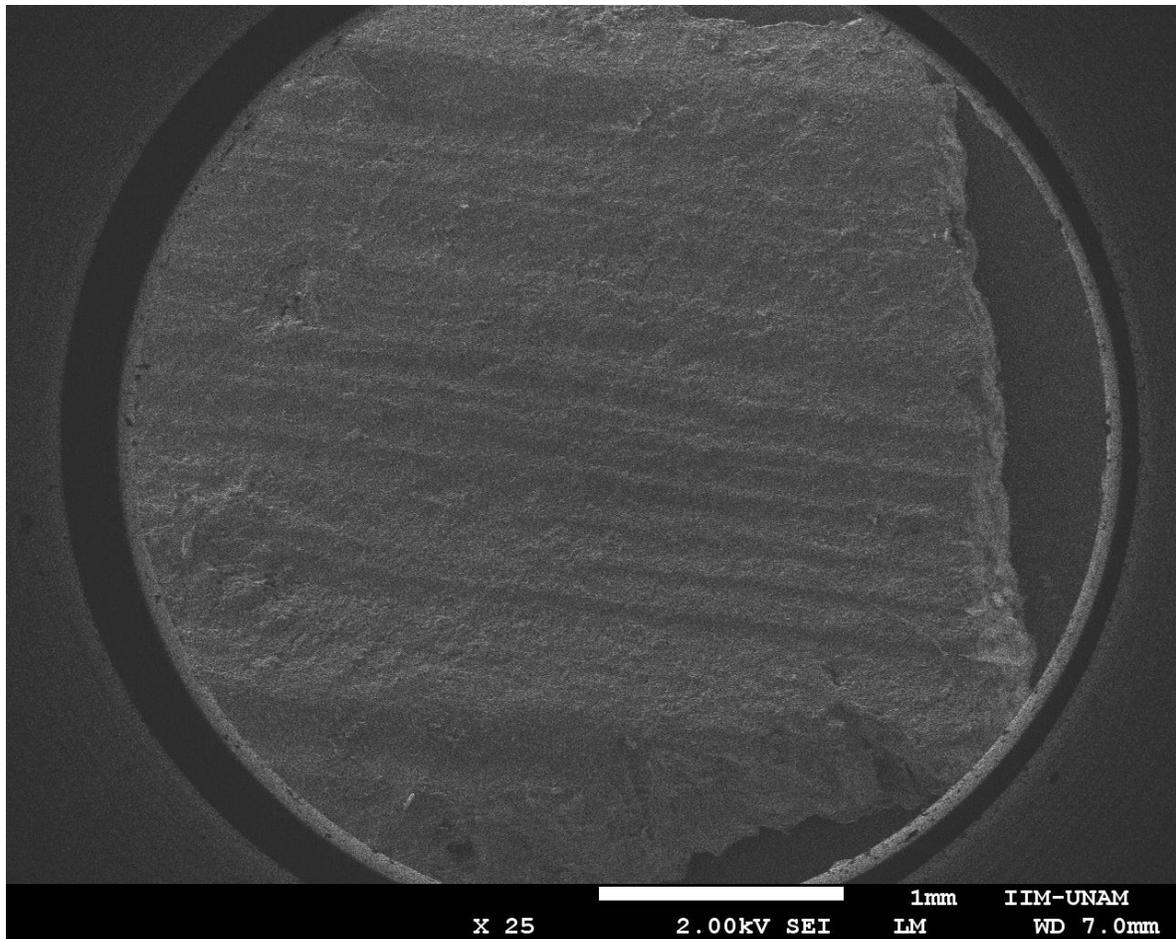
Las imágenes de Microscopio Electrónico de Barrido fueron tomadas con un equipo JEOL JSM-7600F.

En las Figuras 16 y 17, se observa la estructura del tejido compacto y del trabecular. A simple vista, se nota la diferencia en su densidad; mientras que en el tejido esponjoso la

presencia de poros es abundante, en el tejido cortical es esporádica y su tamaño es considerablemente menor.

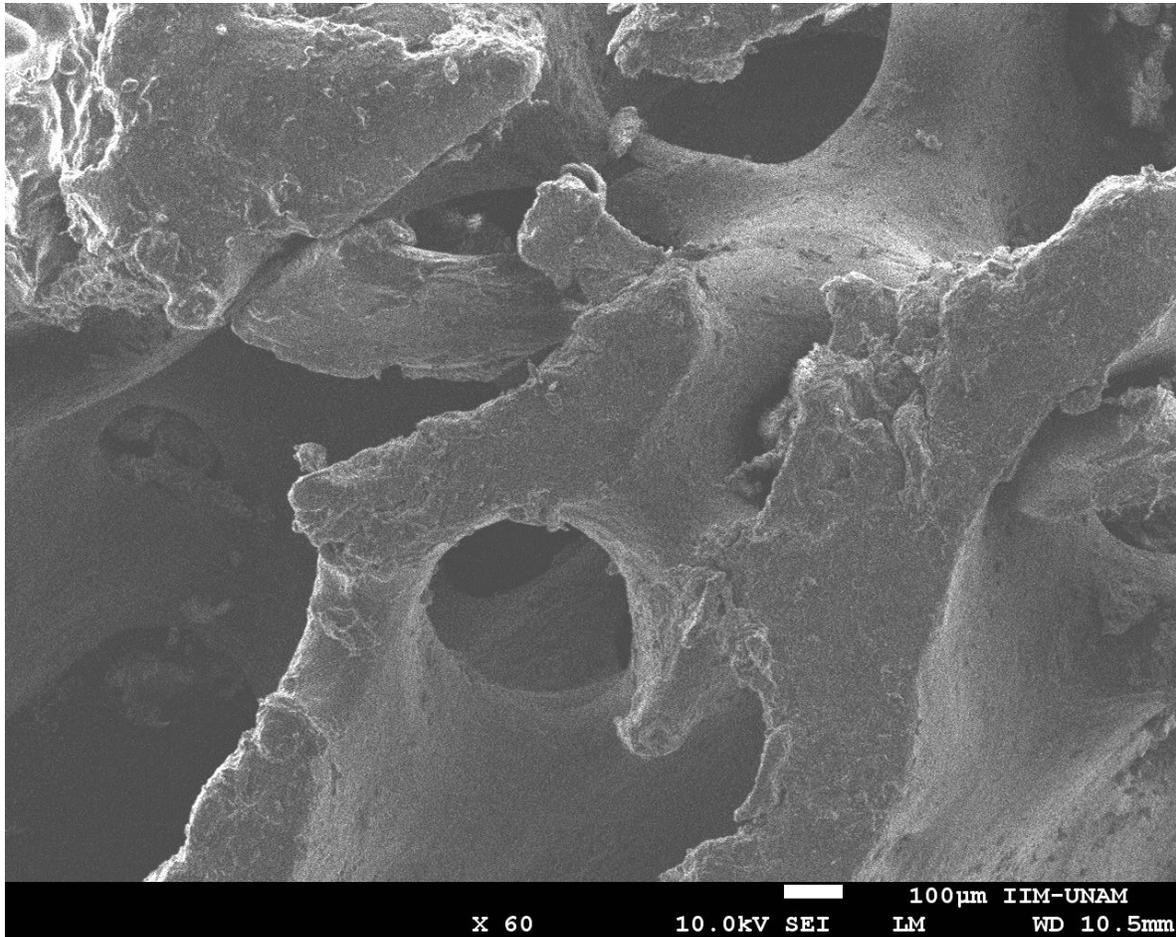


**Figura 16. Tejido trabecular visto con el microscopio SEM.**



**Figura 17. Tejido compacto visto con el microscopio SEM.**

La importancia de la porosidad radica en la osteoconducción y osteointegración, para permitir el crecimiento celular de los osteoblastos y la vascularización. Para la vascularización, el hueso necesita que sus poros tengan un tamaño mayor a  $150\mu\text{m}$ , mientras que para la osteoconducción es necesario que sus poros tengan un diámetro igual o mayor a  $41.32\mu\text{m}$ . Esto debido a que los osteoblastos tienen un diámetro entre  $20$  y  $30\mu\text{m}$ <sup>[59]</sup>. En la Figura 18 se observa que los poros presentes en el tejido trabecular cumplen con las condiciones necesarias para promover estos fenómenos.



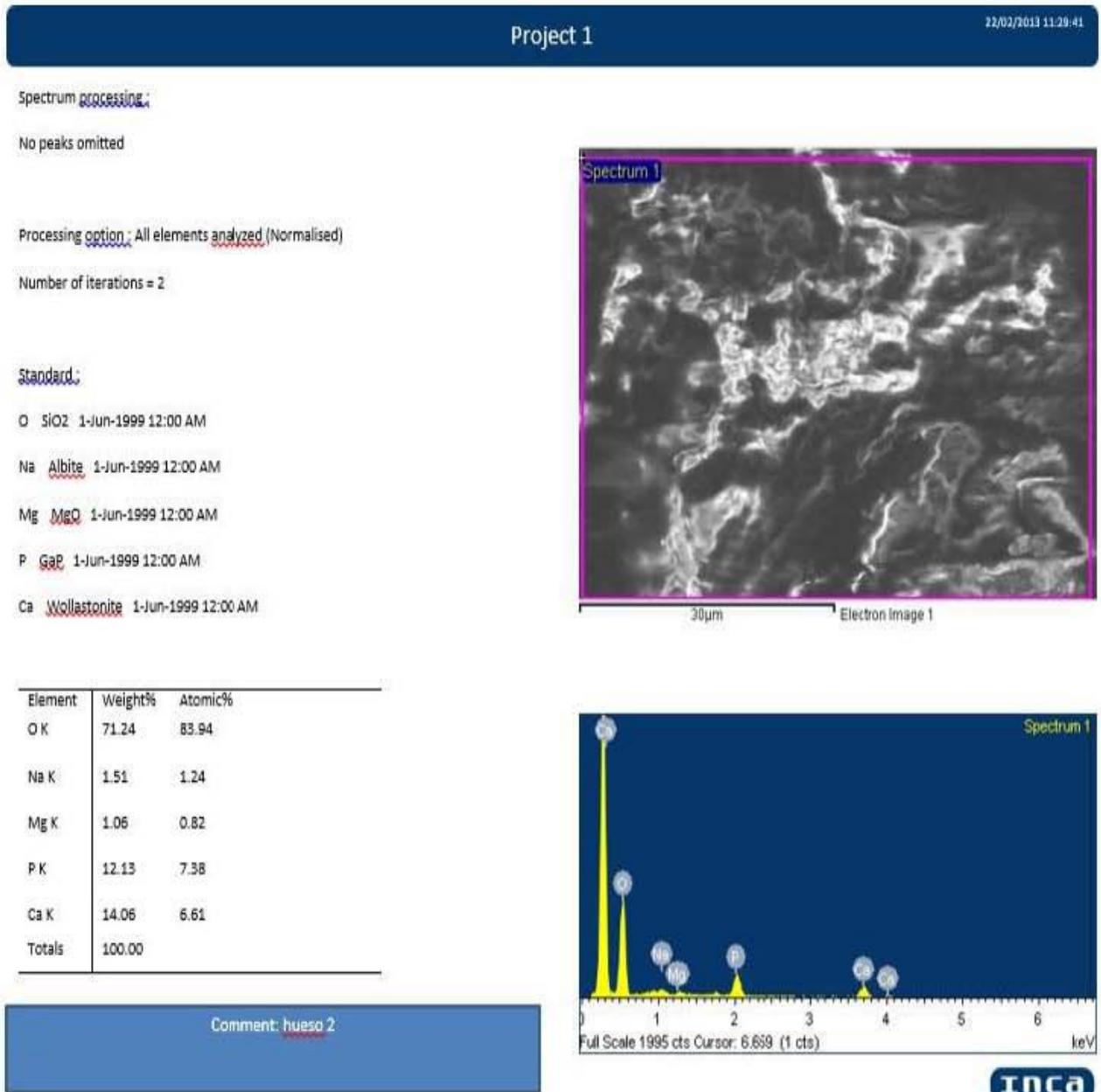
**Figura 18. Tejido trabecular observado con microscopio SEM.**

Dicho lo anterior, es en el hueso trabecular donde se da el fenómeno de vascularización, pues es en sus poros por donde se transporta la médula ósea, la sangre y demás líquidos vitales.

La parte orgánica del tejido óseo está conformada principalmente por una cadena de colágeno y proteínas, mientras que la inorgánica se compone principalmente de hidroxiapatita y un pequeño porcentaje de otros elementos minerales como magnesio y carbonato de sodio.

El agua es el tercer componente más importante del hueso, la hidratación del colágeno juega un papel importante en las propiedades mecánicas del hueso. El agua es la conexión entre el colágeno y las fases minerales. Esta conexión se debilita con el incremento de temperatura.

La parte mineral otorga rigidez al hueso. Cuando ocurre la biomineralización en el hueso, hay un desplazamiento de agua, por lo que un hueso con bajo contenido mineral va a contener más agua que un hueso altamente mineralizado. El proceso de deshidratación va a causar más cambios estructurales y mecánicos en el hueso con un contenido mineral relativamente bajo.



**Figura 13. Espectro químico del tejido cortical.**

## Spectrum processing:

No peaks omitted

Processing option: All elements analyzed (Normalised)

Number of iterations = 2

## Standard:

O SiO<sub>2</sub> 1-Jun-1999 12:00 AM

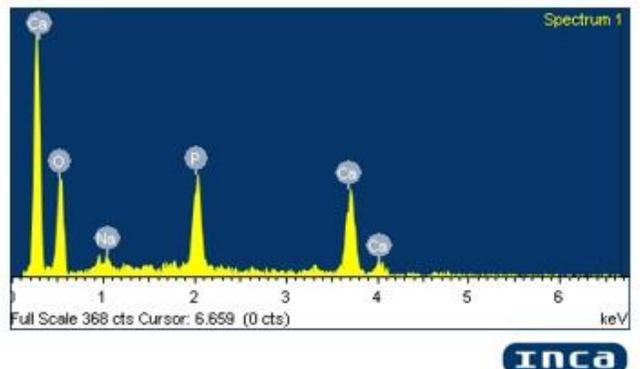
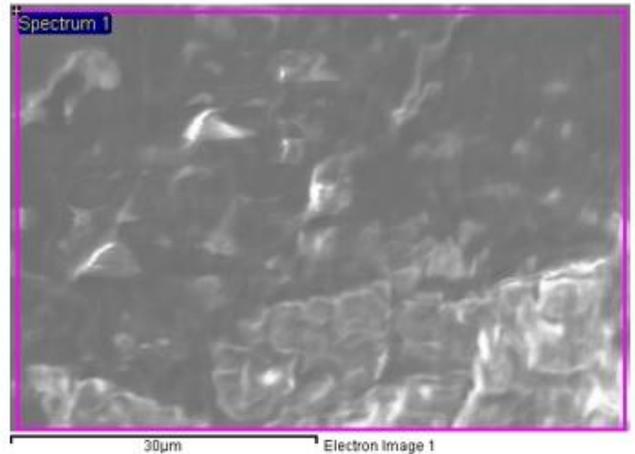
Na Albite 1-Jun-1999 12:00 AM

P GaP 1-Jun-1999 12:00 AM

Ca Wollastonite 1-Jun-1999 12:00 AM

Element	Weight%	Atomic%
O K	44.56	64.47
Na K	1.14	1.15
P K	17.87	13.35
Ca K	36.43	21.04
Totals	100.00	

Comment: Hueso 1



**Figura 14. Espectro químico del tejido trabecular.**

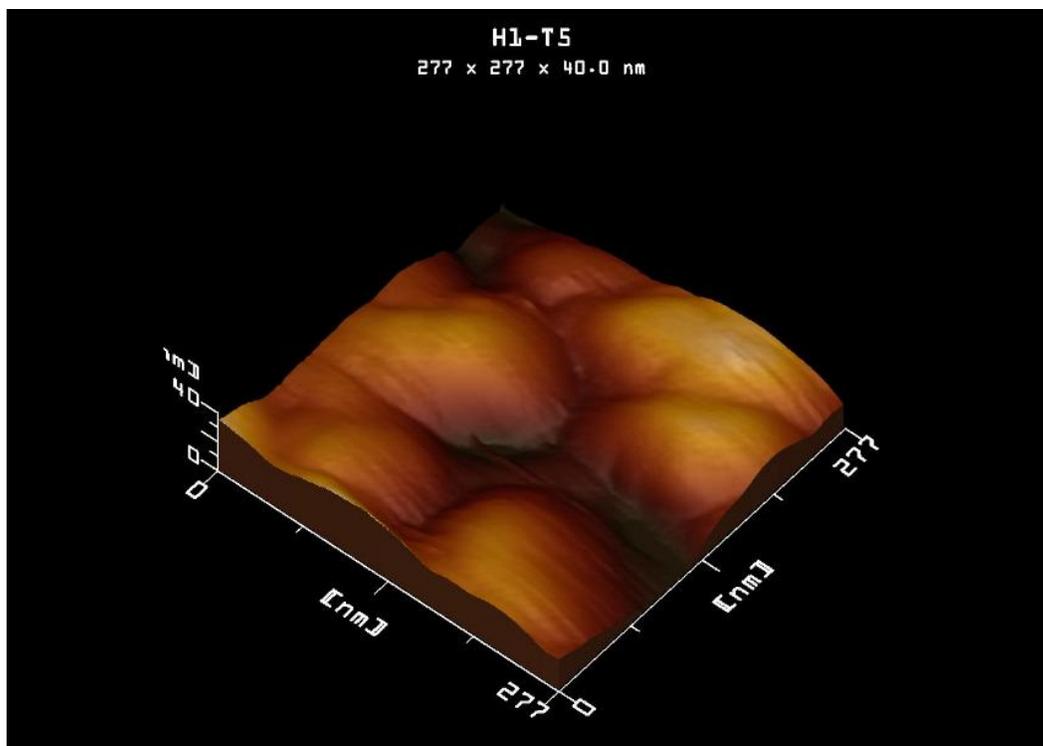
De los espectros químicos anteriores, se explica que el tejido cortical tenga un mayor módulo de elasticidad debido a la presencia de magnesio entre sus componentes, ya que este módulo es el que define la resistencia de los materiales a las fuerzas que deben soportar; por lo tanto un bajo módulo de elasticidad refleja una escasa resistencia al fenómeno de compresión.

De las relaciones calcio-fósforo, se observa que en el tejido trabecular es mayor, más del doble, debido a que hay mayor presencia de agua en el tejido trabecular, volviéndolo más flexible que el tejido cortical.

### 3.2 Microscopio de Fuerza Atómica (AFM).

Las imágenes de Microscopio de Fuerza Atómica fueron tomadas usando un sistema JEOL JSPM-4210. Se utilizó contacto intermitente para la obtención de las siguientes imágenes.

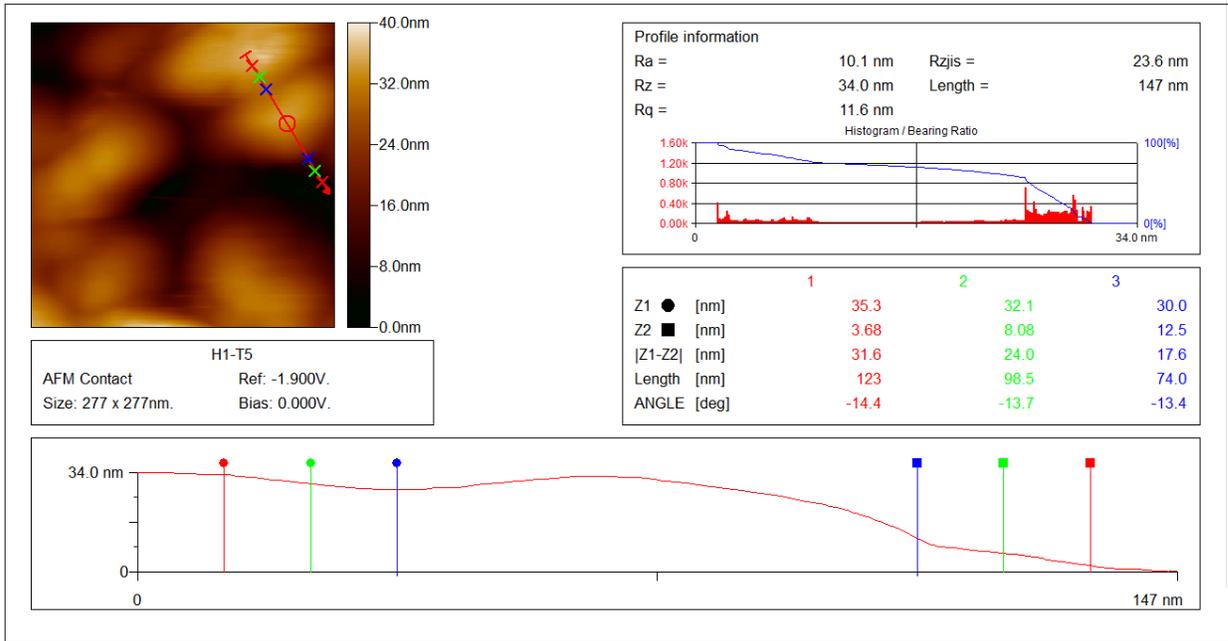
Se obtuvieron imágenes topológicas representativas de la superficie de la muestra con una resolución de nanómetros. Éstas son importantes ya que muestran la rugosidad a nivel nanométrico presente en el tejido, la cual asegura la capacidad del tejido para adherirse a otro.



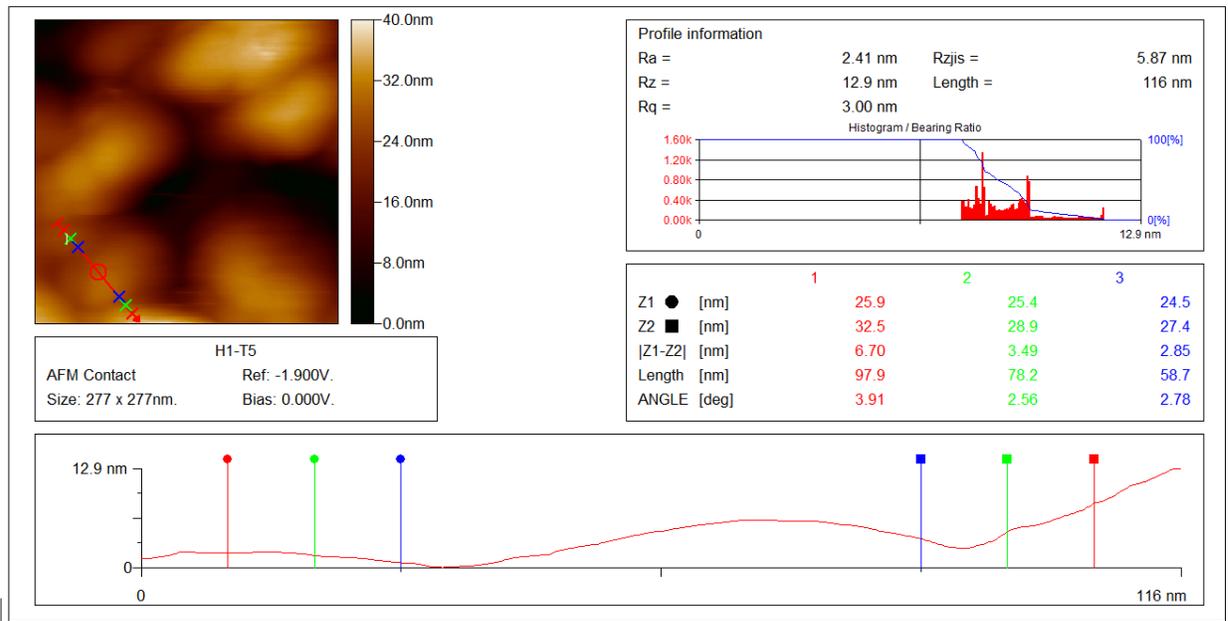
**Figura 19. Morfología del tejido óseo cortical visto con un Microscopio de Fuerza Atómica.**

Con ayuda del Microscopio de Fuerza Atómica y de la difracción de rayos X se puede medir el tamaño de los granos más pequeños que conforman a este tipo de material.

En las siguientes figuras se observa que el tamaño de grano es del orden de 58.7 y 74 nm.

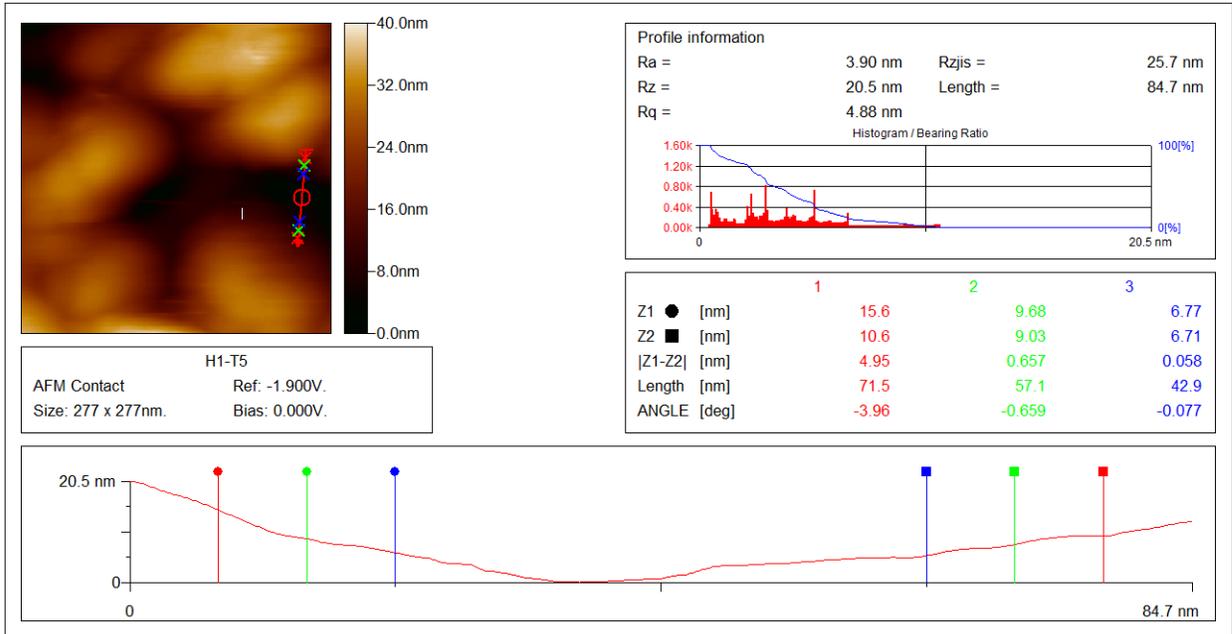


**Figura 20. Tamaño de grano medido con el Microscopio de Fuerza Atómica.**

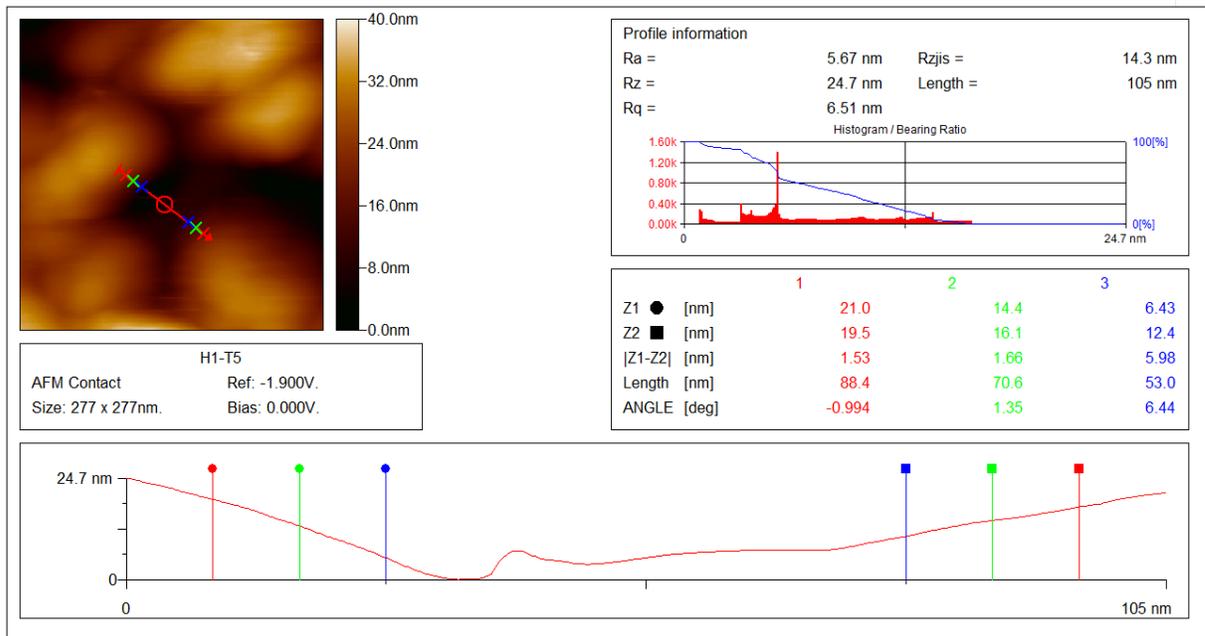


**Figura 21. Tamaño de grano medido con el Microscopio de Fuerza Atómica.**

Usando la misma herramienta, se mide el tamaño de poro presente en el tejido. Dicho tamaño es del orden de 42.9 y 53 nm.

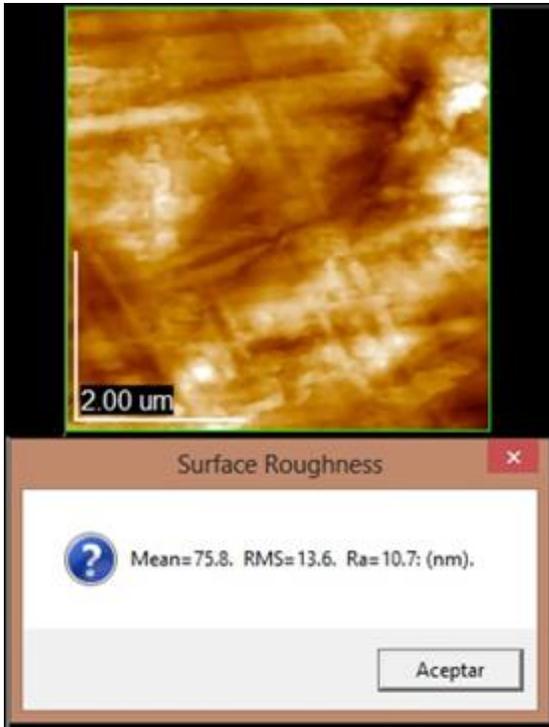


**Figura 22. Tamaño de poro medido con el AFM.**

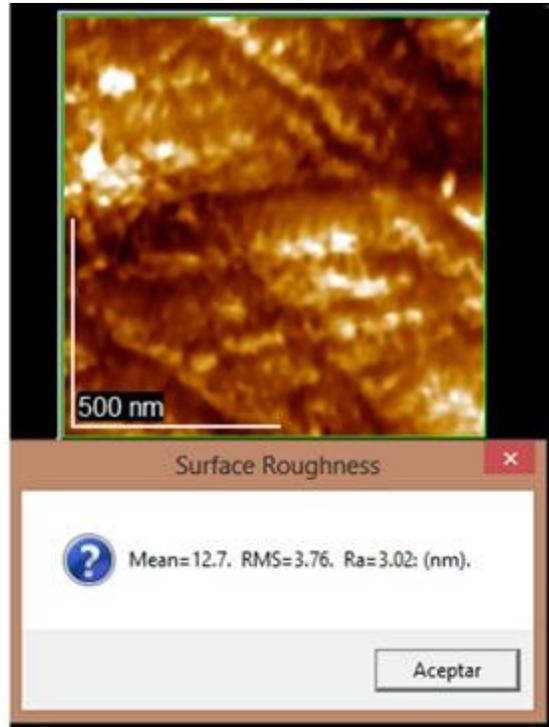


**Figura 23. Tamaño de poro medido con el AFM.**

Usando la misma herramienta, se mide la rugosidad que presenta el tejido. Ésta tiene una magnitud de 12.7 y 75.8 nm.



a)

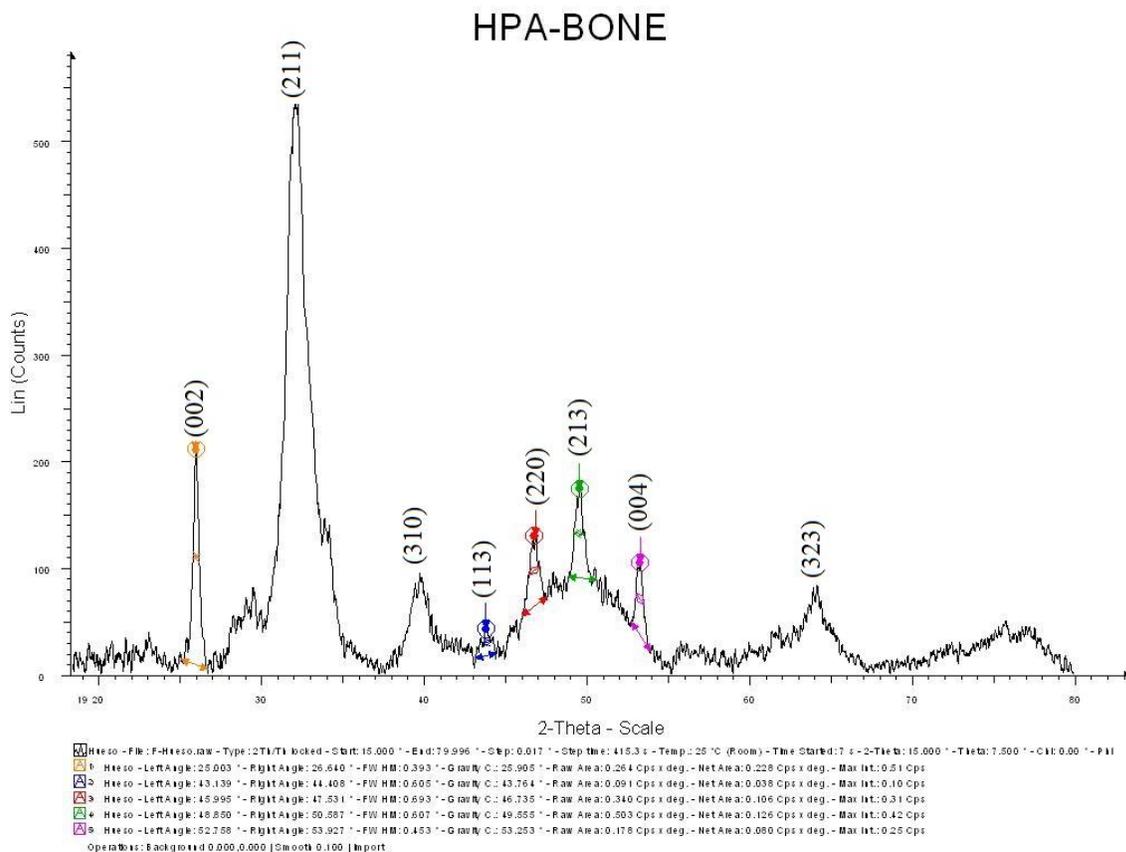


b)

Figura 24. a) y b) mediciones de rugosidad en el tejido óseo.

### 3.3 Difracción de rayos X.

Se obtuvieron los patrones de difracción de rayos X de las muestras obtenidas empleando un equipo Bruker AXS (D8 Advance), usando la radiación de  $\text{CuK}\alpha$  (1.5418 Å), a 35 kV y 30 mA.



**Figura 25. Difracción de rayos X de la hidroxiapatita.**

Las partículas minerales en el hueso son varias formas de apatita (principalmente hidroxiapatita) las cuales tienen un tamaño de grano menor y muestran una reflexión muy ancha con sus picos principales en los siguientes ángulos:

FWHM $\beta$ (grados)	FWHM $\beta$ (radianes)	Centro de gravedad [2 $\Theta$ ]	$\Theta$ (radianes)	D [Å]	Plano cristalino
0.393	0.006859	25.879	0.9746	230.4	(0 0 2)
1.19	0.0207678	31.774	0.961803	77.098	(2 1 1)

**Tabla 2. Valores obtenidos con la difracción de rayos X a tejido óseo.**

Teniendo que:

$$K = 0,9$$

$$\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$$

$$\beta = \frac{\text{grados} * \pi}{180}$$

$$D = \frac{k * \lambda}{\beta * \cos(\Theta)}$$

Comparando los datos de la Figura 22 y de la Tabla 2, se observa que mientras más ancho el pico, más pequeño el tamaño de grano presente. En estos casos, resultó en un valor de 23.04 nm y 7.7 nm respectivamente. Es claro, que estos tamaños de grano, representan a los granos más pequeños de la muestra y por SEM podemos analizar los más grandes, por lo tanto, se tiene que el hueso está conformado por una distribución de granos grandes y pequeños que le dan su carácter morfológico y resistencia a la fractura. La hidroxiapatita está orientada en un determinado plano de dirección preferencial, lo cual le permite al hueso no crecer de manera arbitraria. Este plano es dado por el pico más alto mostrado en el histograma del material, en este caso es el (211).

### 3.4 Microindentación.

En las tablas del Anexo se observan los cambios que sufren los valores conforme se llevan a cabo las pruebas de microdureza a distintas velocidades. En estos resultados se visualiza que acorde se avanza del hueso cortical al esponjoso, se van separando las trabéculas que forman al tejido provocando que sus niveles de dureza y de módulo de elasticidad se incrementen, consiguiendo también que la profundidad máxima que alcanza el penetrador Vickers disminuya.

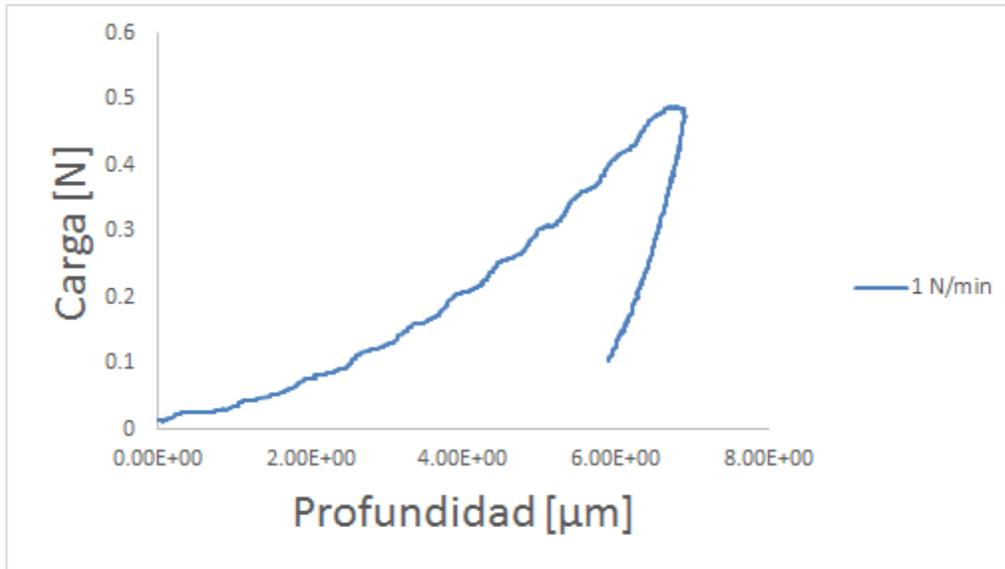
Se observa una variación gradual no lineal, conforme se cambia de región del hueso y la velocidad con que se realizan las pruebas. Lo anterior es prueba de la viscoelasticidad presente en dicho tejido.

En la Tabla 3 se muestra el promedio de los valores calculados a través del microdurómetro Vickers. En esta tabla se observa el incremento en los valores del módulo de Young y de la dureza conforme se aumenta la velocidad de indentación, mientras que la profundidad máxima alcanzada por el indentador disminuye.

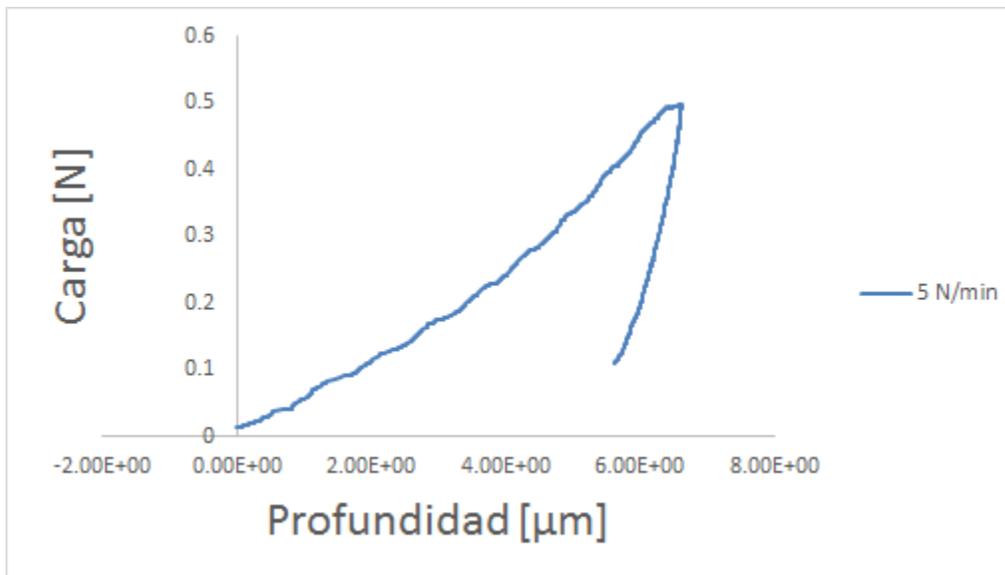
Tipo de hueso.	Velocidad de la prueba [N/min]	Módulo de elasticidad [GPa]	Dureza [HV]	Profundidad máxima [μm]
Hueso cortical.	1	16.91	61.42	6.88
	5	17.13	68.84	6.70
	10	17.48	72.79	6.34
	50	17.51	79.84	6.22
	100	18.25	81.32	6.14
Hueso esponjoso.	1	5.78	50.88	8.35
	5	7.67	58.99	7.84
	10	8.30	65.50	7.50
	50	8.41	68.22	7.44
	100	8.84	89.09	7.34

**Tabla 3. Promedio de los resultados obtenidos de las pruebas realizadas en el microindentador Vickers a las muestras de hueso a diferentes velocidades.**

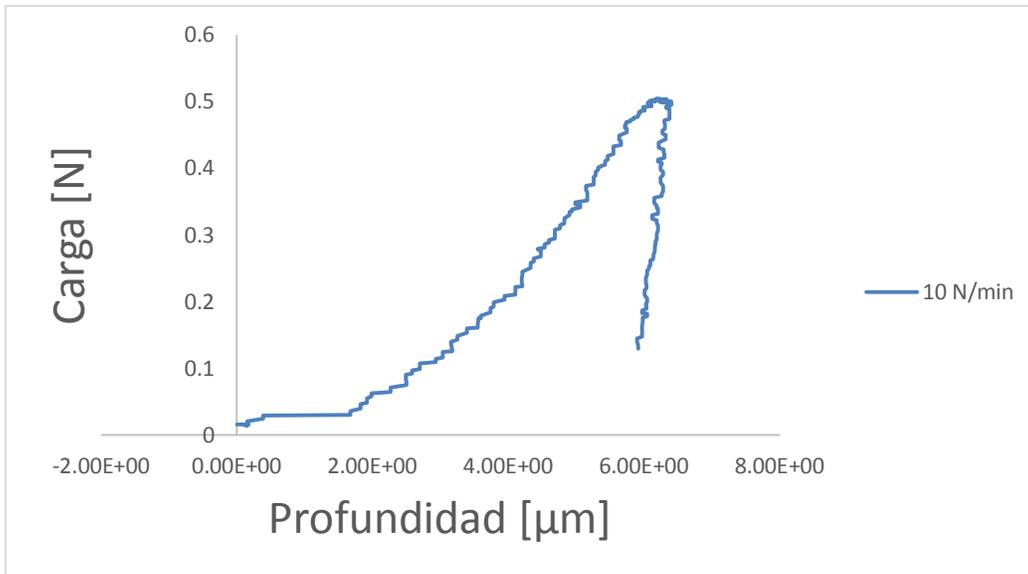
De las gráficas siguientes se observa que conforme se incrementa la velocidad con que se realiza la prueba, el indentador adquiere mayor inestabilidad lo que confiere a la gráfica una apariencia escalonada y que la tasa de descarga sea cada vez más corta.



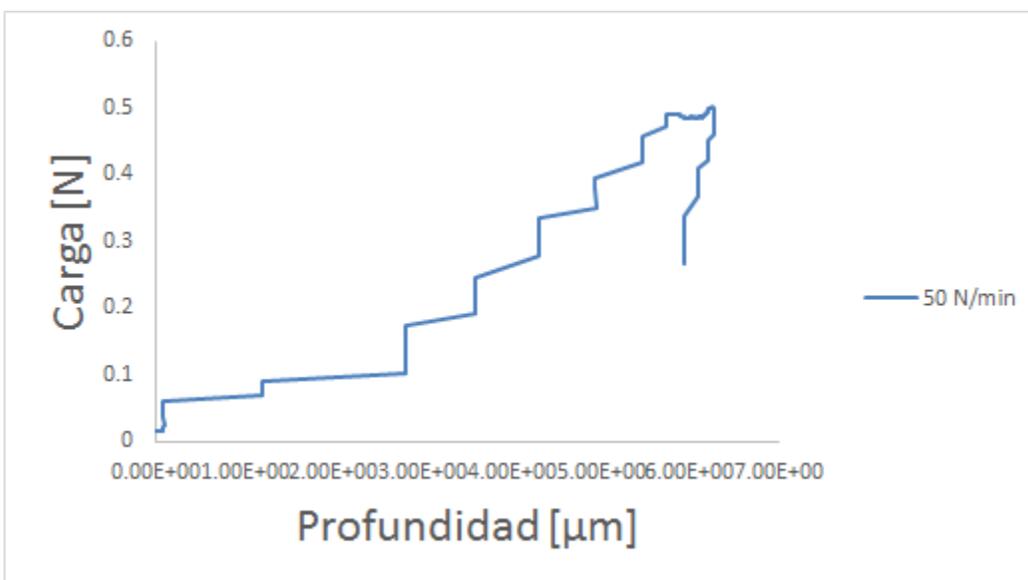
**Figura 26. Comportamiento de hueso cortical con velocidad de carga de 1 N/min.**



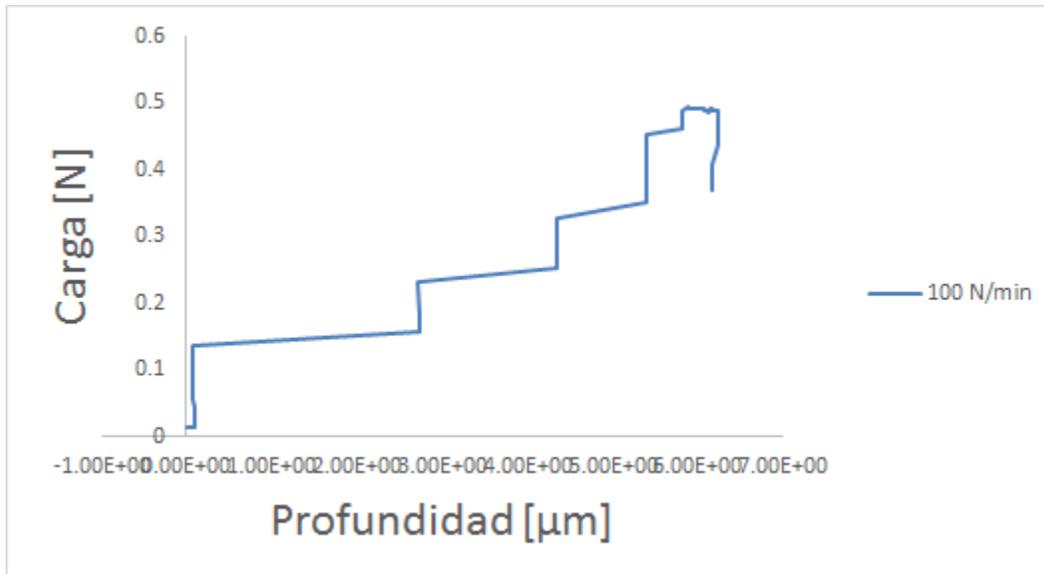
**Figura 27. Comportamiento de hueso cortical con velocidad de carga de 5 N/min.**



**Figura 28. Comportamiento de hueso cortical con velocidad de carga de 10 N/min.**



**Figura 29. Comportamiento de hueso cortical con velocidad de carga de 50 N/min.**

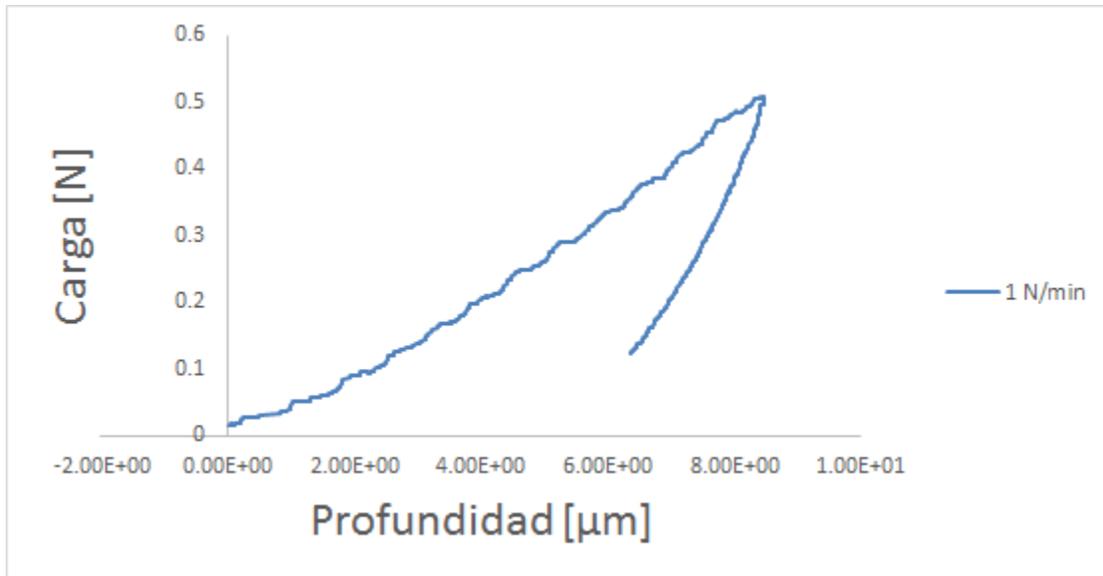


**Figura 30. Comportamiento de hueso cortical con velocidad de carga de 100 N/min.**

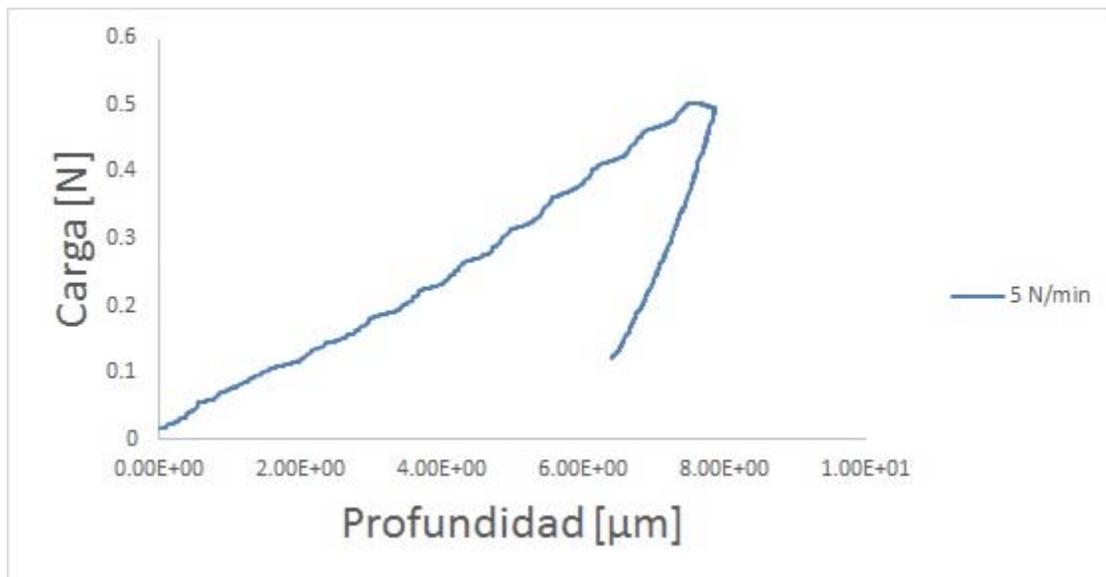
Comparando las gráficas anteriores, se reconoce que al momento de aplicar la carga con una velocidad de 1 N/min se alcanza más rápido el punto de descarga que con el resto de las velocidades, provocando esto que la profundidad que alcanza el microindentador sea menor en comparación con las demás profundidades alcanzadas. Mientras que conforme se aumenta la velocidad, la descarga poco a poco va dejando de estar presente en las gráficas, lo que significa que la energía para aplicar la carga está siendo disipada con mayor velocidad, el indentador alcanza una mayor profundidad pero adquiere mayor inestabilidad.

También se observa que conforme se aumenta la velocidad, el indentador tarda más tiempo en aplicar la carga, lo que se refleja en una cuasi constante al inicio de la gráfica-

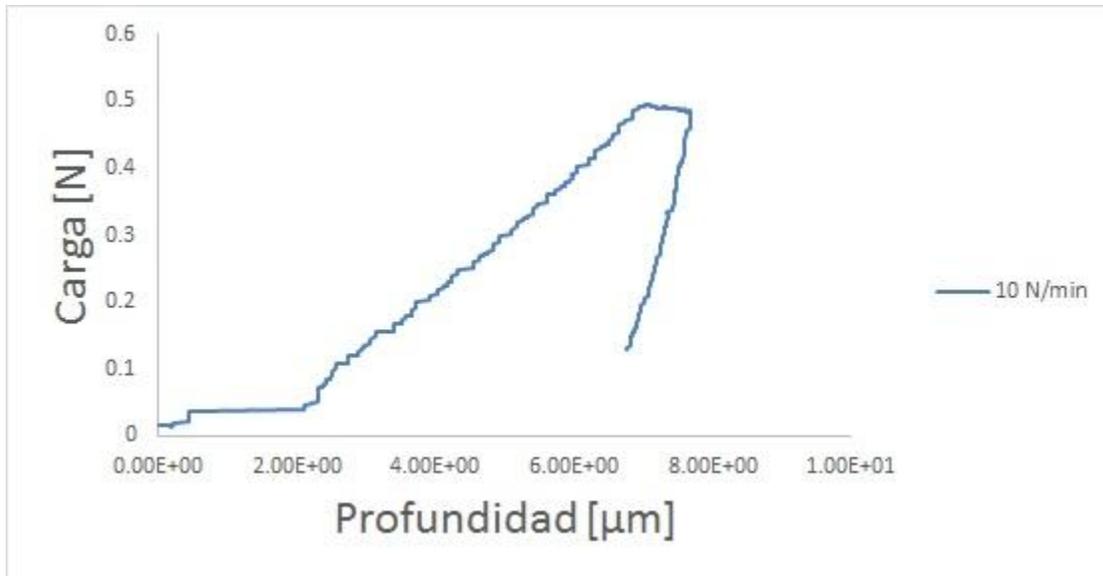
Lo mismo pasa con las gráficas siguientes correspondientes al tejido trabecular.



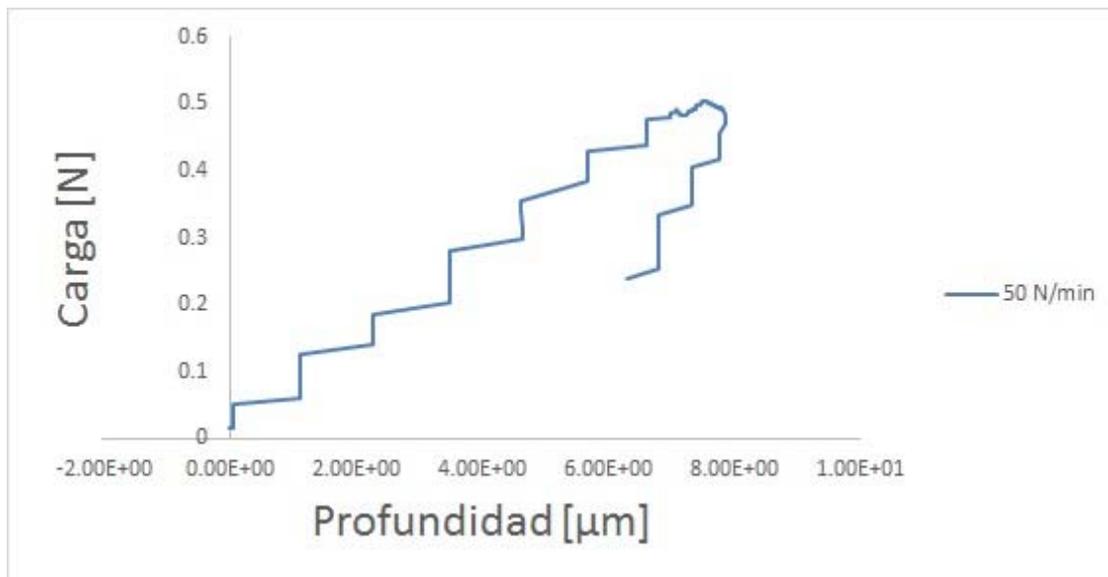
**Figura 31. Comportamiento de hueso esponjoso con velocidad de carga de 1 N/min.**



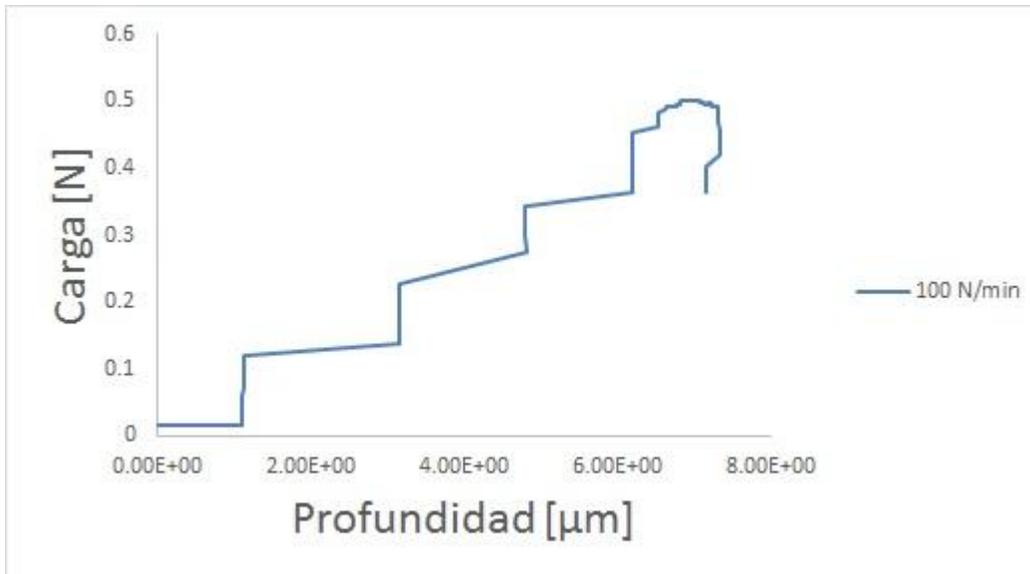
**Figura 32. Comportamiento de hueso esponjoso con velocidad de carga de 5 N/min.**



**Figura 33. Comportamiento de hueso esponjoso con velocidad de carga de 10 N/min.**



**Figura 34. Comportamiento de hueso esponjoso con velocidad de carga de 50 N/min.**



**Figura 35. Comportamiento de hueso esponjoso con velocidad de carga de 100 N/min.**

El comportamiento mecánico del tejido óseo se ve afectado por la velocidad de carga lo que indica que se trata de un material viscoelástico.

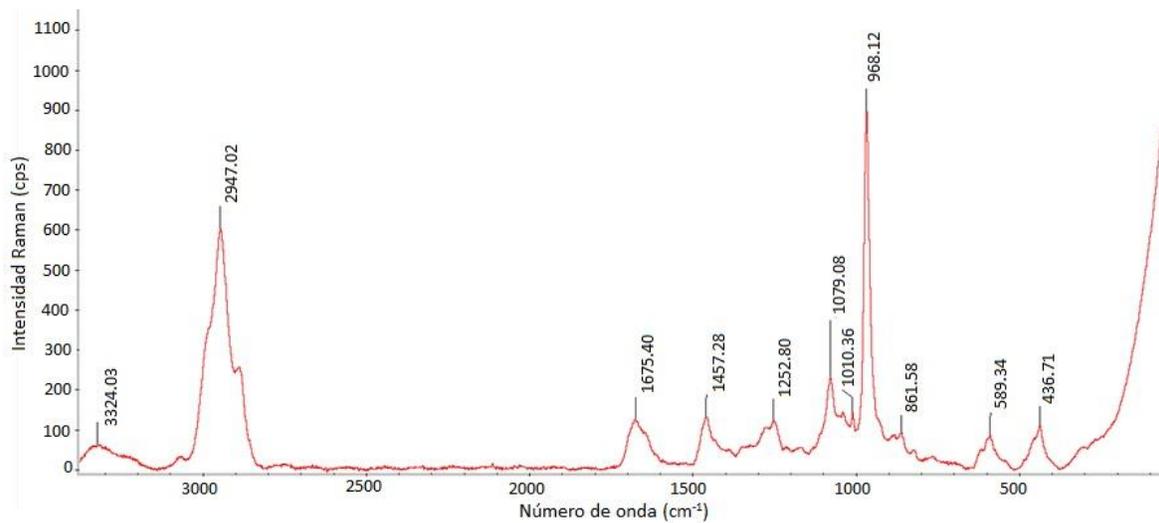
La influencia de la velocidad de carga y descarga se observa en las Figuras 26 y 27. De las mismas también se observa que la rigidez del hueso cortical es mayor a la del trabecular, lo que confirma que éstos no presentan un mismo módulo aparente de elasticidad.

Es conveniente mencionar que los valores obtenidos para el módulo de elasticidad representan magnitudes de comparación entre los mismos además de encontrarse dentro de los límites reportados por la literatura, es decir, se tiene reportado que el tejido trabecular presenta una viscoelasticidad de entre 4-12 GPa mientras que el cortical/o compacto presenta valores de entre 15-20 GPa. En nuestro caso se tienen los valores promedio de entre 7.5 – 8.2 GPa para el tejido trabecular y de entre 17.4-18.2 GPa para el cortical. Por otra parte, el grado de deformación depende de la aplicación de las cargas, la reorientación de los componentes orgánicos y la migración del agua, es por esta razón que los valores alcanzados por el tejido cortical son mayores a los resultantes en el esponjoso, como se muestra en la Tabla 3 y en las del Anexo.

### 3.5 Espectroscopía vibracional (Raman).

Los análisis de espectroscopía Raman fueron tomados con un Thermo Scientific modelo DXR Raman Microscope. Se utilizó un láser de 532 nm, con potencia de 10 mW, luz blanca corregida, fluorescencia corregida.

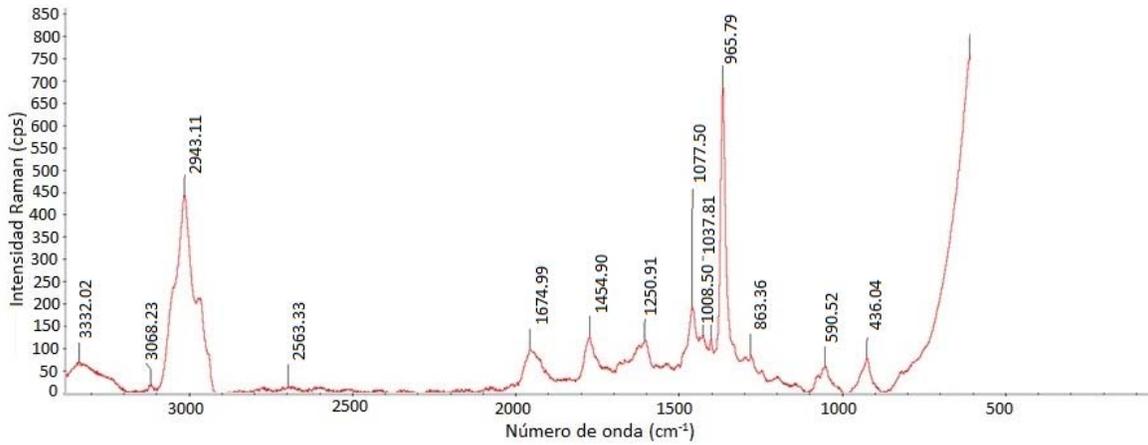
Estos análisis muestran que, en el transcurso de su desarrollo, el hueso presenta diferencias con respecto al grado de cristalinidad de su componente mineral principal: la hidroxiapatita. Esta información se obtiene a partir de la intensidad de fluorescencia de los distintos componentes minerales (representada en el eje Y de las gráficas), ya que una mayor intensidad en el espectro Raman indica menor organización o cristalinidad.



**Figura 28. Espectro Raman de tejido cortical seco.**



**Figura 29. Sección donde se realizó el estudio Raman en el tejido cortical seco. Objetivo 20x.**

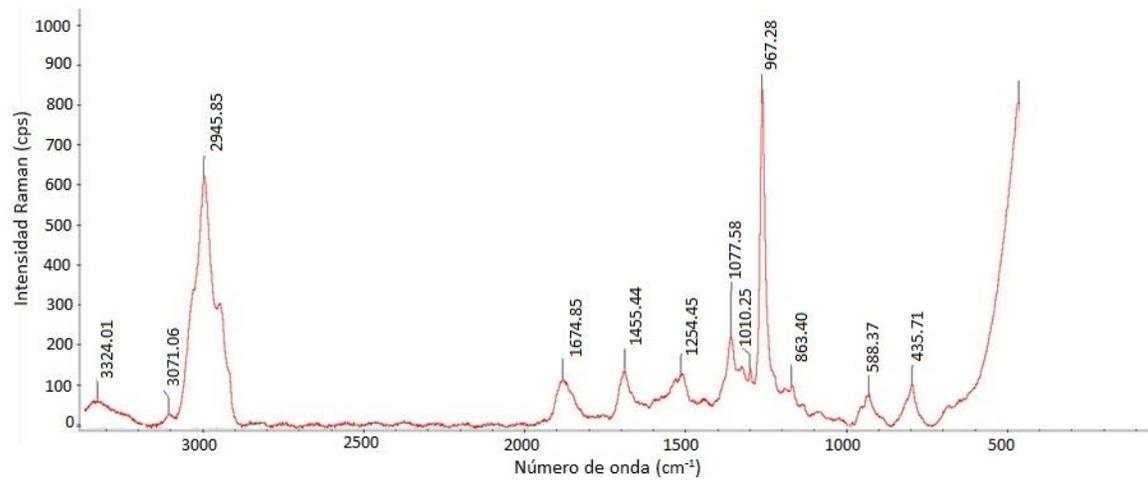


**Figura 30. Espectro Raman de tejido cortical húmedo.**



**Figura 31. Sección donde se realizó el estudio Raman en el tejido cortical húmedo. Objetivo 20x.**

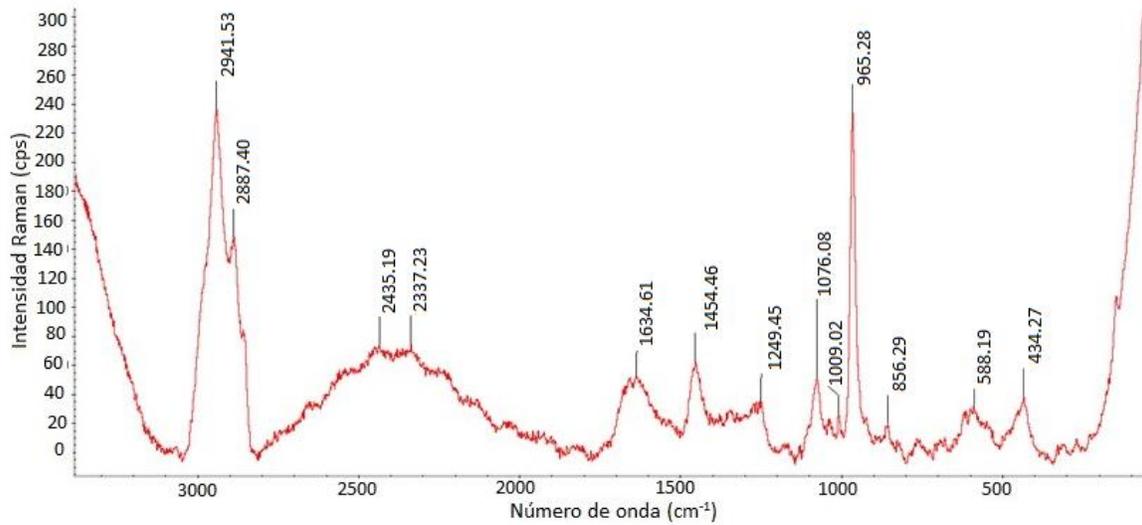
Comparando los espectros del tejido cortical seco y húmedo; se nota que al absorber agua, el tejido se hace cada vez más viscoelástico, por lo que la vibración se mueve ligeramente y el pico se va haciendo cada vez menos ancho. Este mismo comportamiento se observa en el tejido trabecular.



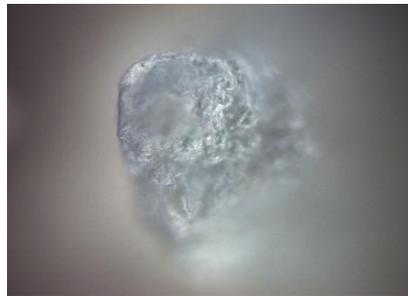
**Figura 32. Espectro Raman de tejido esponjoso seco.**



**Figura 33. Sección donde se realizó el estudio Raman en el tejido esponjoso seco. Objetivo 20x.**



**Figura 34. Espectro Raman de tejido esponjoso húmedo.**



**Figura 35. Sección donde se realizó el estudio Raman en el tejido esponjoso húmedo. Objetivo 20x.**

Se observa que en hueso trabecular los valores de intensidad son más bajos que en cortical, al igual que en seco los valores son más altos que en húmedo, lo cual se explica debido a que la vibración molecular que alcanzan los átomos de éstas moléculas son menores gracias a la presencia de agua y a la falta de mineralización que presenta el tejido esponjoso.

En la siguiente Tabla se muestran los elementos detectados por la espectroscopía vibracional y los rangos en que se presentan.

<b>Molécula de matriz extracelular</b>	<b>Rango [cm<sup>-1</sup>]</b>
Hidroxiapatita y Fosfato $\nu_2$ (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	430
Hidroxiapatita y Fosfato $\nu_4$ (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	590
Colágeno tipo 2 (Prolina)	850
Carbonato $\nu_1$ (CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )	860 - 1070
Glucosaminoglucanos	899
Colágeno tipo 2 (Prolina)	920
Glucosaminoglucanos	937-945
Colágeno tipo 2	937
Fosfato $\nu_1$ (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	960 - 1033
Hidroxiapatita	961
Condrotina-6-sulfato	995
Colágeno tipo 2	1002
Hidroxiapatita	1044
Ácido hialurónico	1045
Condrotina-6-sulfato	1065
CO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1072
Hidroxiapatita	1074
Ácido hialurónico	1090
Ácido hialurónico	1130
Ácido hialurónico	1150
Ácido hialurónico y Colágeno tipo 2	1205
Colágeno tipo 2	1220- 1280
Amida III	1230-1300
Colágeno	1254
Glucosaminoglucanos	1330 - 1340
Glucosaminoglucanos	1375
CH <sub>2</sub> wag	1447 - 1453
Colágeno	1448

Amida II	1520 - 1620
Amida I	1630 - 1720
Colágeno	1668
Médula ósea	2800 - 3050
Colágeno	2939

**Tabla 4. Elementos representados en los espectros Raman.**

## Capítulo 4. Discusión.

Con las imágenes del SEM se diferencia la densidad entre los dos tipos de tejido óseo. Mostrándose que al tejido compacto, la escasa aparición de poros y la presencia de magnesio en su composición química, le confieren la rigidez necesaria para soportar las cargas que le son aplicadas.

Miculescu menciona que la relación Ca/P se registra entre 1.65 y 1.69 para el hueso cortical después de ser calentado a una temperatura menor de 300°C. En este trabajo, la relación Ca/P en dicho tipo de tejido es de 1.57; fenómeno debido a la ausencia del Magnesio, encargado de fijar el calcio en el hueso, mineral que si se encuentra en el ensayo mencionado.

Las medidas de los poros realizados con el SEM y el AFM, indican que este tejido presenta dicha morfología para proporcionar procesos durante el desarrollo como la osteoconducción y la vascularización. EL promedio del tamaño de macroporo obtenido por SEM corresponde aproximadamente a 200  $\mu\text{m}$ , lo que permite que se lleve a cabo la vascularización del hueso; mientras que el tamaño de microporo medido con AFM es de 69.2 nm, lo que permite la osteoconducción, importante proceso para la regeneración ósea.

Durante la formación ósea y/o en procesos de regeneración, se ha reportado que el magnesio juega un papel importante en la formación de los cristales de hidroxiapatita, ya que es el encargado de la asimilación del calcio que se ingiere a través de la dieta, y suprime la acción de la hormona paratohormona que aumenta la resorción ósea por la estimulación de los osteoclastos que llevan a generar un ambiente ácido que degrada el tejido mineral del hueso. La paratohormona también es clave en libera más calcio al torrente sanguíneo para así regular el equilibrio entre calcio y fósforo en el organismo. Asimismo; el magnesio tiene la función de activar la enzima necesaria para formar hueso nuevo como la fosfata alcalina e influye en la actividad de la vitamina D, necesaria para que el calcio se fije en el tejido mineral del hueso. Por ello; una baja de magnesio en el organismo se refleja en un cese en el crecimiento del hueso, disminución en la actividad osteoblástica, osteopenia y fragilidad ósea. El magnesio previene la fragilidad ósea desestabilizando los cristales de hidroxiapatita y actúa sinérgicamente con el ATP para estabilizar fosfatos de calcio amorfos y prevenir la formación de hidroxiapatita altamente cristalina. Por ello en el hueso se menciona que el mineral óseo con baja concentración de magnesio da como resultado cristales más largos y definidos, que pueden ser más quebradizos que los cristales amorfos [60].

En el análisis de las imágenes obtenidas del microscopio de fuerza atómica y de los espectros de difracción de rayos X, es posible conocer el tamaño de los granos más

pequeños presentes en el material; mientras que en las imágenes del microscopio electrónico de barrido, proporcionan el tamaño de los granos más grandes.

Midiendo con el AFM el tamaño de grano, se ve que tiene un tamaño de 74.6 nm; mientras que con el difractor de rayos X vemos que el grano más pequeño corresponde al plano (2 1 1), con un tamaño total de 7.7 nm. Y que la rugosidad presente en el material es de un valor entre 12.7 y 75.8 nm.

Con el microdurómetro, se muestra que mientras más rápido se aplica una carga al tejido, mayor dureza presenta el mismo, esto se demuestra con la variación que sufre el módulo de elasticidad.

En el hueso cortical, este módulo varía entre 16.91 y 18.25 GPa mientras que el del esponjoso se encuentra en un rango menor debido a su estructura como sólido celular, abarca desde los 5.78 hasta los 8.84 GPa. Estos datos obtenidos están en concordancia con lo reportado en estudios donde han evaluado las propiedades mecánicas del tejido mineral óseo [61, 62].

Para materiales viscoelásticos, una parte de la energía de deformación se almacena en el material como energía potencial y el resto se disipa en forma de calor sin tener en cuenta si los niveles de energía son grandes o pequeños.

De las figuras 23 y 24, se observa que a medida que aumenta la velocidad de carga y descarga, el indentador pierde estabilidad y la gráfica adquiere una forma cada vez más escalonada.

Del estudio Raman: las posiciones, intensidades y anchos de las bandas de  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{CO}_3^{2-}$  cambian debido a las perturbaciones locales en la red cristalina causadas por la composición de iones locales. Asimismo, diversos estudios sugieren que el agua presente en el hueso juega un papel importante en el comportamiento mecánico, viscoelástico y funcional del tejido óseo, demostrando también que el tejido cortical es 30% más mineralizado que el trabecular [30-33].

## Capítulo 5. Conclusiones.

Al estudiar la morfología de hueso se ve que la rigidez del material está dada por los elementos presentes, como son el calcio, el fósforo, el zinc, el flúor, el sodio y el magnesio.

De la morfología se saca la rugosidad; se observa que mientras más dispareja sea la superficie del tejido, la rugosidad será mayor.

En cuanto al carácter mecánico, se nota que al aplicar la carga afecta el comportamiento general.

Para elaborar una prótesis que tenga una funcionalidad óptima es necesario que tenga ciertas características, por ejemplo:

- No sufra de corrosión, al estar en contacto con los elementos de los que están formados los tejidos es posible que sufra este fenómeno, lo que provocaría una toxicidad en el cuerpo. Además, sería recomendable que si la prótesis sufre del fenómeno de la corrosión, los productos resultantes no sean tóxicos para el cuerpo humano.
- Que tenga la elasticidad suficiente (entre 5-18 GPa) para no fracturarse ni romperse al momento de aplicar la carga total que pertenece al cuerpo que lo va a usar.

**Anexo.**

Número de muestra	Módulo de elasticidad [GPa]	Dureza [HV]	Profundidad máxima [ $\mu\text{m}$ ]
Muestra 1	21.06	61.91	6.05
	25.96	75.77	5.5
	21.5	58.63	6.22
	18.63	44.89	6.95
	18.61	57.78	6.35
	18.04	37.72	7.65
	15.6	40.39	7.37
	11.26	16.86	11.15
	9.95	24.18	9.49
9.35	15.28	11.74	
Muestra 2	25.62	65.51	5.89
	19.81	80.87	5.5
	18.77	54.95	6.51
	18.72	62.46	6.17
	18.32	128.68	4.75
	17.27	110.52	5.02
	15.94	84.12	5.58
	14.05	48.97	6.88
	13.38	66.62	6.24
11.12	58.33	6.75	
Muestra 3	16.21	53.48	6.62
	19.96	81.86	5.47
	18.31	100.1	5.17
	18.31	57.24	6.4
	16.88	56.16	6.48
	16.28	50.01	6.78
	15.59	57.55	6.46
	15.26	49.19	6.87
	14.9	86.25	5.61
12.72	56.41	6.66	

**Valores obtenidos para hueso cortical con una velocidad de 1 N/min.**

Número de muestra	Módulo de elasticidad [GPa]	Dureza [HV]	Profundidad máxima [ $\mu\text{m}$ ]
Muestra 1	22.31	89.42	7.27
	19.6	78.37	6.58
	19.49	65.43	6.99
	18.36	51.01	6.64
	16.9	63.95	6.09
	16.68	58.54	6.42
	15.83	52.45	6.61
	15.06	74.17	6.64
	14.35	61.1	6.38
	14.3	59.18	6.43
Muestra 2	18.37	57.36	6.38
	22.27	99.35	7
	21.2	82.04	6.48
	18.01	73.81	6.79
	17.99	70.58	6.89
	17.37	83.53	6.57
	15.97	61.24	6.24
	15.59	65.56	6.16
	14.86	42.24	7.35
	13.75	42.08	7.42
Muestra 3	19.4	90.96	6.3
	18.54	43.43	7.17
	17.48	110.02	6.96
	17.38	60.81	6.22
	16.87	140.74	7.48
	16.74	65.08	7.12
	15.59	50.21	6.8
	15.22	60.14	6.41
	14.43	59.22	6.49
	14.02	53.11	6.77

**Valores obtenidos para hueso cortical con una velocidad de 5 N/min.**

Número de muestra	Módulo de elasticidad [GPa]	Dureza [HV]	Profundidad máxima [ $\mu\text{m}$ ]
Muestra 1	22.9	88.73	5.26
	22.75	79.9	5.46
	19.1	84.14	5.5
	18.11	69.24	5.91
	17.99	74.01	5.75
	17.61	70.74	5.84
	16.98	80.97	5.59
	16.41	67.58	6.03
	16.01	46.73	6.98
	15.68	50	6.84
Muestra 2	12.51	38.08	7.77
	23.4	166.65	7.16
	20.39	109.63	4.85
	19.36	103.28	5.85
	17.81	80.57	5.54
	17.45	81.59	5.54
	16.69	62.12	6.26
	16.31	65.92	6.12
	15.01	62.67	6.22
	12.05	27.23	8.96
Muestra 3	15.9	58.24	6.37
	22.63	144.4	5.37
	20	36.41	8.03
	19.45	46.2	6.91
	17.98	75.2	5.72
	16.45	75.73	5.82
	15.65	90.14	5.5
	14.9	78.76	5.8
	14.29	19.82	10.28
	12.7	48.87	7.08

**Valores obtenidos para hueso cortical con una velocidad de 10 N/min.**

Número de muestra	Módulo de elasticidad [GPa]	Dureza [HV]	Profundidad máxima [ $\mu\text{m}$ ]
Muestra 1	17.93	63.76	6.06
	22.96	77.17	5.56
	22.24	83.87	6.33
	20.83	187.25	6.82
	16.35	81.13	5.64
	15.96	67.49	6.96
	15.86	89.21	5.53
	14.94	63.94	6.21
	14.32	51.94	6.76
	12.74	63.98	6.33
Muestra 2	27.29	67.17	5.74
	21.05	121.06	6.6
	18.4	62.11	6.2
	14.61	76.77	5.88
	14.23	53.52	6.69
	14.17	60.16	6.41
	14.12	69.37	6.1
	14.05	75.42	5.93
	13.57	54.61	6.74
	12.77	56.66	6.57
Muestra 3	30.01	183.6	6.74
	21.61	63.84	6.03
	21.41	67.91	5.87
	18.6	62.01	6.13
	18.3	138.04	6.65
	17.35	76.05	5.72
	16.36	77.98	5.69
	15.03	70.53	6.05
	14.19	65.74	6.21
	13.97	62.85	6.38

**Valores obtenidos para hueso cortical con una velocidad de 50 N/min**

Número de muestra	Módulo de elasticidad [GPa]	Dureza [HV]	Profundidad máxima [ $\mu\text{m}$ ]
Muestra 1	30.09	78.07	5.33
	27.97	55.13	6.23
	26.11	77.59	5.47
	21.06	160.13	4.3
	21	74.57	5.64
	18.78	94.4	5.21
	14.72	244.6	4.27
	13.29	89.99	5.61
	10.97	45.79	7.24
	10.33	117.82	5.54
Muestra 2	16.93	303.83	3.99
	28.06	70.31	5.65
	22.63	42.86	7.16
	22.48	57.67	6.26
	20.6	77.61	5.56
	18.47	67.22	5.89
	15.12	43.78	7.16
	14.95	70.34	5.94
	11.06	83.68	5.89
	10.22	45.31	7.35
Muestra 3	24.8	50.21	6.6
	21.65	92.79	5.17
	20.59	45.67	6.89
	19.28	47.97	6.86
	18.57	30.59	8.41
	17.27	69.02	5.94
	16.42	59.06	6.42
	12.22	31.46	8.44
	11.15	51.84	7.03
	10.82	60.18	6.61

**Valores obtenidos para hueso cortical con una velocidad de 100 N/min.**

Número de muestra	Módulo de elasticidad [GPa]	Dureza [HV]	Profundidad máxima [ $\mu\text{m}$ ]
Muestra 1	5.35	67.98	7.45
	7.55	95.64	6.31
	7.35	85.38	6.52
	6.75	44.1	7.92
	5.87	53.15	7.65
	5.78	42.04	8.23
	5.72	67.94	7.32
	5.36	68.83	7.37
	5.08	48.21	8.28
	4.15	26.27	10.29
Muestra 2	7.63	56.07	7.28
	8.18	42.7	7.82
	5.25	23.14	10.42
	4.97	24.6	10.26
	4.33	51.19	8.48
	4.27	19.33	11.36
	3.99	44.24	8.81
	3.97	51.94	8.65
	3.83	30.77	9.85
	3.13	15.1	12.88
Muestra 3	11.03	78.61	5.99
	9.6	58.11	6.85
	8.88	52.64	7.25
	6.63	72.66	6.86
	6.06	52.34	7.65
	5.72	41.67	8.43
	5.03	33.63	9.11
	4.69	80.96	7.58
	3.79	42.94	9.08
	3.62	54.38	8.68

**Valores obtenidos para hueso esponjoso con una velocidad de 1 N/min.**

Número de muestra	Módulo de elasticidad [GPa]	Dureza [HV]	Profundidad máxima [ $\mu\text{m}$ ]
Muestra 1	8.02	44.1	7.8
	7.41	48.9	7.54
	7.22	49.99	7.48
	6.77	64.54	7.09
	6.68	69.92	7.93
	6.13	24.51	10
	5.9	37.05	8.67
	5.61	71.79	7.23
	5.44	38.82	8.68
	4.03	43.43	8.88
Muestra 2	15.78	207.07	7.34
	9.53	64.4	8.57
	8.99	57.85	6.91
	8.95	94.8	6.05
	8.82	46.38	7.46
	8.36	53.41	7.35
	7.88	66.67	6.85
	7.58	48.92	7.48
	6.81	51.42	7.5
	5.89	67.45	7.25
Muestra 3	12.11	83.45	8.86
	9.89	65.84	6.56
	8.55	64.24	7.8
	8.45	53.07	7.23
	8.3	46.85	7.56
	8.22	64.16	6.86
	7.31	54.23	7.42
	5.79	28.89	9.39
	5.25	30.69	9.43
	4.3	26.92	10.04

**Valores obtenidos para hueso esponjoso con una velocidad de 5 N/min.**

Número de muestra	Módulo de elasticidad [GPa]	Dureza [HV]	Profundidad máxima [ $\mu\text{m}$ ]
Muestra 1	7.74	81.94	6.44
	6.87	49.15	7.7
	6.8	91.45	6.5
	6.37	68.55	7.09
	5.52	58.39	7.59
	5.25	47.71	8.24
	5.19	101.42	7.04
	5.19	84.02	7.2
	5.08	45.38	8.35
	4.39	65.04	8.05
Muestra 2	17.89	186.58	4.27
	16.81	143.15	4.62
	15.28	68.7	6.06
	15.23	96.14	5.32
	14.61	147.04	4.74
	11.28	39.48	7.67
	10.74	62.11	6.52
	8.6	82.17	6.28
	7.89	63.97	6.93
	5.95	47.51	7.99
Muestra 3	11	44.2	7.47
	8	44.63	7.7
	7.68	37.24	8.26
	7.64	36.95	8.3
	7.27	68.48	6.87
	7.11	52.36	7.46
	4.8	9.94	10.92
	4.37	17.3	10.83
	4.32	13.92	11.99
	4.23	10.07	10.73

**Valores obtenidos para hueso esponjoso con una velocidad de 10 N/min.**

Número de muestra	Módulo de elasticidad [GPa]	Dureza [HV]	Profundidad máxima [ $\mu\text{m}$ ]
Muestra 1	11.32	40.23	9.45
	10.36	40.65	5.97
	10.27	55.89	7.07
	7.65	56.45	8.02
	7.48	54.13	9.4
	7.15	67.47	6.97
	7.05	57.35	7.82
	6.86	56.28	7.94
	5.45	51.92	6.72
	5.08	73.39	7.52
Muestra 2	11.25	54.7	6.87
	9.58	49.23	5.68
	8.51	53.7	6.84
	8.39	43.78	7.77
	7.22	44.52	9.05
	6.36	70.97	7.93
	6.17	35.96	9.21
	6.11	51.01	7.78
	5.14	53.33	10.6
	5.03	29.2	9.64
Muestra 3	13.86	100.08	5.35
	12.67	128.05	5.16
	12.03	50.32	8.19
	12	88.87	5.78
	10.09	51.24	8.14
	9.76	103.31	5.81
	8.03	132.07	6.98
	7.6	178.21	5.67
	7.06	95.24	6.48
	6.91	78.97	7.44

**Valores obtenidos para hueso esponjoso con una velocidad de 50 N/min.**

Número de muestra	Módulo de elasticidad [GPa]	Dureza [HV]	Profundidad máxima [ $\mu\text{m}$ ]
Muestra 1	16.76	46.98	6.92
	12.97	309.42	4.41
	10.47	66.12	6.45
	9.62	143.41	5.44
	9.56	39.99	7.8
	6.66	12.84	12.89
	6.21	23.85	9.97
	4.33	35.36	9.17
	4.24	76.11	7.8
	3.83	47.42	8.75
Muestra 2	15.87	44.53	7.22
	15.69	31.3	8.38
	13.62	66.04	6.22
	11.72	165.16	4.94
	10.72	95.02	5.71
	9.22	83.93	6.1
	8.74	25.53	9.48
	8.36	85.68	6.33
	6.12	31.68	8.98
	4.22	56.75	8.27
Muestra 3	13.71	62.53	6.31
	10.84	132.87	5.85
	8.57	98.54	6.05
	8.32	76.82	6.42
	7.56	419.15	5.92
	7.19	43.27	7.85
	5.98	93.65	6.83
	5.8	95.86	6.84
	4.15	37.5	9.14
	4.08	125.28	7.63

**Valores obtenidos para hueso esponjoso con una velocidad de 100 N/min.**

## **Bibliografía.**

- [1] Bartlett, R. *Introduction to sports biomechanics. Analyzing Human Movement Patterns*. Rutledge. 2007. 2da Edición. Pág. 255 ISBN 0-203-46202-5.
- [2] Zioupos, P., Gresle, M., Winwood, K. *Fatigue strength of human cortical bone: Age, physical, and material heterogeneity effects*. Wiley InterScience. Noviembre 16, 2007. DOI: 10.1002/jbm.a.31576
- [3] Vennin, Séverine. *Fracture of Bone Using Microindentation*. Engineering Mechanics, Department of Engineering Mechanics Dissertations & Theses. University of Nebraska, Lincoln. 2010, pág. 14.
- [4] Lalegname, A., Sfer, D., Etse, G. *Análisis micromecánico de huesos*. Mecánica Computacional Vol. XXI, Santa Fe- Paraná, Argentina, 2002. Págs. 2530-2538.
- [5] *Materiales elásticos en biología. Huesos y Músculos. El mecanismo de la contracción muscular*. <http://usuarios.multimania.es/centroestudios/fv/tema2.pdf>. Revisado el: 10 de octubre de 2014.
- [6] Ramírez, E., Ortiz, A., Schouwenaars, R., Ruiz, O. *Metodología para el modelado del comportamiento mecánico de hueso esponjoso a partir de sus microestructuras*. Ingeniería Investigación y Tecnología. Vol. XI. Núm. 2. 2010 199-216, ISSN 14057743 FI-UNAM
- [7] Rincón, E., Ros, A., Claramunt, R., Arranz, F. *Caracterización mecánica del material óseo*. Revista Tecnol@ y desarrollo. ISSN 1696-8085 Vol. II, 2004.
- [8] Mohamad, Shahnaz bin Samsul Bahari. *Response of human bone synthetic under impact load using finite element method*. Universidad de Malasia, Pahang. Noviembre, 2009.
- [9] Yin, L., Venkatesan, S., Kalyanasundaram, S., Qin, Q. *Effect of microstructure on micromechanical performance of dry cortical bone tissues*. MATERIALS CHARACTERIZATION 60(2009)1424– 1431.
- [10] Nordin, M., Frankel, V. *Biomecánica básica del sistema musculoesquelético*. McGraw-Hill Interamericana . Madrid, España. 2004. Págs. 11- 14.
- [14] <http://www.uaz.edu.mx/histo/TortorAna/ch07/ch07.htm>. Revisado el: 10 de octubre de 2014.

- [15] Tözeren, A. *Human Body Dynamics: Classical Mechanics and Human Movement*. Springer. ISBN 0-387-98801-7. Pág. 9.
- [16] Martínez, D. *Determinación experimental de las propiedades mecánicas del tejido óseo*. Director: Armando Ortiz Prado. Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, 2010.
- [17] Galik, K. *The effect of design variations on stresses in total ankle arthroplasty*. Universidad de Pittsburgh. Abril, 2002.
- [18] Sawhney, G.S. *Fundamentals of Biomedical Engineering*. NEW AGE INTERNATIONAL (P) LIMITED, PUBLISHERS, ISBN (13): 978-81-224-2549-9. Págs. 40-41.
- [19] Panjabi, M., White, A., Southwick, W. *Mechanical Properties of Bone as a Function of Deformation*. The Journal of Bone & Joint Surgery. 1973; 55: 322-330.
- [20] Reilly, D., Bursten, A. *The Mechanical Properties of Cortical Bone*. *J Bone Joint Surg Am*. 1974;56:1001-1022.
- [21] Zhang, W., Liu, Y., Kassab, G. *Viscoelasticity reduces the dynamic stresses and strains in the vessel wall: implications for vessel fatigue*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Oct; 293(4):H2355-60. Epub 2007 Jun 29. PMID: 17604330 . PUBLIMED.GOV
- [22] Zussman, E., Yarin, A.L., Nagler, R.M. *Age- and Flow- dependency of Salivary Viscoelasticity*. Noviembre, 2006. *Journal of Dental Research*. doi: 10.1177/154405910708600316 *JDR* March 2007 vol. 86 no. 3 281-285
- [23] Puig de Morales, M., Turner, K., Butler, J., Fredberg, J., Suresh, S. *Viscoelasticity of the human red blood cell*. Abril, 2007. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C597–C605, 2007. First published April 11, 2007; doi:10.1152/ajpcell.00562.2006.
- [24] Bharucha, A., Hubmayr, R., Ferber, I., Zinsmeister, A. *Viscoelastic properties of the human colon*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001 Aug; 281(2):G459-66. PMID: 11447026.
- [25] Koolstra, J.H., van Eijden, T. *Consequences of Viscoelastic Behavior in the Human Temporomandibular Joint Disc*. *J Dent Res*. 2007 Dec; 86(12):1198-202. PMID: 18037655.

- [26] Jamal, R., Roughley, P., Ludwig, M. *Effect of glycosaminoglycan degradation on lung tissue viscoelasticity*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001 Feb; 280(2):L306-15. PMID: 11159010.
- [27] Aljuri, N., Venegas, J., Freitag, L. *Viscoelasticity of the trachea and its effects on flow limitation*. J Appl Physiol. 2006 Feb; 100(2):384-9. Epub 2005 Oct 20. PMID: 16239614.
- [28] Currey, J. D. *Anelasticity in bone and echinoderm skeletons*. Department of Biology, University of York, Heslington, York. Journal of Experimental Biology (1965), 43, 279-291
- [29] Lievers, W.B., Poljsak, A.S., Waldman, S.D., Pilkey, A.K., *Effects of dehydration-induced structural and material changes on the apparent modulus of cancellous bone*. Medical Engineering & Physics 32 (2010) 921–925.
- [30] Latarjet M., Ruiz A. *Anatomía humana Vol. 1*. Ed. Panamericana. 3ra edición, 1999. Págs. 19- 22, 746-750.
- [31] Miralles, R., Misericòrdia C. *Biomecánica clínica del aparato locomotor*. Masson. Barcelona, España. 2000. p.p. 12-13.
- [32] Nyman, J.S., Roy, A., Shen, X., Acuna, R. L., Tyler, J. H., Wang, X. *The influence of water removal on the strength and toughness of cortical bone*. Journal of Biomechanics. Volume 39, Issue 5 , Págs. 931-938, 2006. PII: S0021-9290(05)00064-3. doi:10.1016/j.jbiomech.2005.01.012
- [33] Jiménez, J. *Propiedades mecánicas del hueso esponjoso porcino en pruebas de tracción*. 2008.
- [34] Islas, A., Guillén, G., Olvera, M. *Viscoelasticidad de hilos de poliéster usando el modelo de Zurek y su modificado*. ContactoS 72, 37-42 (2009).
- [35] Standard Test Method for Microindentation Hardness of Materials, E 384- 99, ASTM International.
- [36] Nava, E. *Modelado del Ensayo de Microindentación Instrumentada en Tejido Óseo*. Director: Dr. Raphael Schouwenaars Franssens. Facultad de Ingeniería, UNAM, 2011. Pág. 22.
- [37] Vaz, M. F., Canhão, H., Fonseca, J. E. (2011). *Bone: A Composite Natural Material, Advances in Composite Materials - Analysis of Natural and Man-Made Materials*, Dr. Pavla Tesinova (Ed.), ISBN: 978-953-307-449-8, InTech.

- [38] Cruz, G., Toledo, S., Lima, A. *Morphological and Chemical Analysis of Bone Substitutes by Scanning Electron Microscopy and Microanalysis by Spectroscopy of Dispersion Energy*. Braz Dent J (2007) 18(2): 129-133. ISSN: 0103-6440.
- [39] Oppolzer, F., *Particle Beam Microanalysis. Fundamentals, methods and applications*. Ed. Vch, 1990, Págs. 93-96.
- [40] <http://micron.ucr.edu/public/manuals/Sem-intro.pdf>. Revisado el: 2 de enero de 2015.
- [41] Palacios de Borao, G. *Supermicroscopía electrónica*. Instituto de Microbiología General y Aplicada, 1950. Págs. 19-34, 58-78.
- [42] Malohlava, J., Zapletalova, H., Tomankova, K., Kolarova, H. *Atomic force microscopy: Studying mechanical properties of a cell*. Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology (A. Méndez- Vilas, Ed.) 2012, FORMATEX. Págs. 528-532.
- [43] Mazeyar, P. et al. *Microscopic methods to study the structure of scaffolds in bone tissue engineering: a brief review*. Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology (A. Méndez- Vilas, Ed.) 2012, FORMATEX Págs. 625-638.
- [44] Thurner, P. et al. *Imaging of Bone Ultrastructure using Atomic Force Microscopy*. Modern Research and Educational Topics in Microscopy. A. Méndez- Vilas and J. Días (Eds). FORMATEX (2007) Págs. 37- 48.
- [45] Cheni, J. *Scanning tunneling microscopy*. Oxford University Press, 1993, Págs. 171-175, 313-330. Págs. 37-48
- [46] Stroncio, J. *Scanning tunneling microscopy*. y. Academic Press,inc, 1994, Págs. 86-91, 357,368
- [46] <http://www.readcube.com/articles/10.1038/nrmicro905>. Revisado el: 10 de enero de 2015.
- [47] Treviño, A. *Estudio de caracterización de superficies cerámicas por microscopio de fuerza atómica (AFM) y microscopía electrónica de barrido (SEM) en función a diferentes tratamientos de superficies*. Director: M. José Arturo Fernández Pedrero. Facultad de Odontología, UNAM, 2008. Pág. 13
- [48] Sasaki, K. et al. *The evaluation of preferential alignment of biological apatite (bap) crystallites in bone using a transmission x-ray diffraction method*. JCPDS- International Centre for Diffraction Data (2008) ISSN: 1097- 0002.

- [49] [http://www.upct.es/~dimgc/webjoseperez/DOCENCIA\\_archivos/Aplicaciones\\_DRX\\_Apuntes\\_y\\_ejercicios.pdf](http://www.upct.es/~dimgc/webjoseperez/DOCENCIA_archivos/Aplicaciones_DRX_Apuntes_y_ejercicios.pdf). Revisado el: 11 de diciembre de 2014.
- [50] West, A. slis State. *Chemistry and its applications*. Ed. J. Wiley & sons, 1989, Págs. 1-4, 115-187, 318-58.
- [51] <http://servicios.fis.puc.cl/rayosx/teoria.html>. Revisado el: 7 de diciembre de 1024.
- [52] Jamal, R., Roughley, P., Ludwig, M. *Effect of glycosaminoglycan degradation on lung tissue viscoelasticity*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001 Feb; 280(2):L306-15. PMID: 11159010.
- [53] Nacarino Meneses, C. et al. *Aportaciones de la paleohistología humana al estudio de biomateriales*. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio. Vol. 51, 6, 313-320, Noviembre- Diciembre 2012. ISSN 0366-3175 e ISSN 2173-0431. Doi: 10.3989/cyv.432012
- [54] Carmejane, O., Morris, M., Davis, M. *Bone Chemichal Structure Response to Mechanical Stress Studied by High Pressure Raman Spectroscopy*. Calcif Tissue Int (2005) 76: 207-213. DOI: 10.1007/s00223-004-0168-z.
- [55] Kalonakis, K., Orkoula, M., Kontoyannis, C. *Analysis of Bone Composition with Raman Spectroscopy*. <http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/5187/1/PMO031.pdf>. Revisado: 28 de abril de 2015.
- [56] Jimenez, SS, *Micro-Raman spectroscopy: a powerful technique for materials research*, J Microelectronics, 2000; 31: 419-427.
- [57] Larkin, P., *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. Elsevier, USA (2011)
- [58] [http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401539/execute%20de%20agosto/leccin\\_42\\_instrumentacin\\_en\\_espectroscopia\\_raman.html](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401539/execute%20de%20agosto/leccin_42_instrumentacin_en_espectroscopia_raman.html). Revisado el: 22 de septiembre de 2014.
- [59] Rodríguez, N. *Efecto de la matriz ósea bovina sobre la diferenciación de células mesenquimales humanas a osteoblastos*. Director: María Cristina Piña Barba. Facultad de Medicina, UNAM, 2013. Pág. 65
- [60] Brief Critical Reviews. *Magnesium Supplementation and Osteoporosis*. Nutrition Reviews , Vol. 53, No. 3. March 1995:71-80.

[61] Ángeles, J. *Caracterización Mecánica del Comportamiento Viscoelástico de Muestras de Hueso Trabecular Bovino*. Director: M. en I. Edgar Isaac Ramírez Díaz. Facultad de Ingeniería, UNAM, 2014. Pág. 8

[62] Rincón, E. et al. *Caracterización Mecánica del Material Óseo*. *Tecnología y Desarrollo*. Revista de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Vol. II, Año 2004. ISSN: 1696-8085.

[63] Miculescu, F. et al. *Effect of Heating Process on Micro Structure Level of Cortical Bone Prepared for Compositional Analysis*. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. Vol. 6, No. 1, Enero-Marzo 2011, Págs. 225- 233.