



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERIA DE MATERIALES

“SINTESIS, CARACTERIZACION Y OPTIMIZACION DE NANOFIBRAS DE HIDROXIAPATITA OBTENIDAS POR EL METODO DE MICROONDAS”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIA E

INGENIERIA DE MATERIAES

P R E S E N T A

M.C. NÉSTOR EFRÉN MÉNDEZ LOZANO

TUTOR: Dr. LUIS MIGUEL APÁTIGA CASTRO

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. MIGUEL ÁNGEL OCAMPO MORTERA

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

Dr. ALEJANDRO MANZANO RAMÍREZ

CINVESTAV

CIUDAD.DE.MÉXICO.. ENERO 2017



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.

RESUMEN

Se sintetizaron nanofibras de hidroxiapatita por el método hidrotermal asistido por microondas a 170 °C usando una mezcla de CaNO₃, KOH, K₂HPO₄ y ácido glutámico como precursores. La reacción se llevó a cabo en el interior de los vasos de cuarzo a una presión de 80 bares. El tiempo de reacción se varió de 15 hasta 45 minutos; mientras tanto la temperatura, la potencia de microondas, y la composición del precursor se mantuvieron constantes. La composición de la fase cristalina se estudió por difracción de rayos X, mientras que los grupos funcionales, modos vibracionales, morfología de la superficie y la nanoestructura se estudiaron por Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier, Espectroscopia Raman, Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución, respectivamente. Se obtuvieron nanofibras de hidroxiapatita con diámetros en el orden de nanómetros y longitudes de micrómetros, su superficie parece ser lisa con formas y bordes bien definidos. La longitud aumentó a medida que el tiempo de reacción aumentó. De acuerdo con los patrones de difracción de rayos X, se observaron orientaciones cristalinas preferenciales en las direcciones [211] y [300], lo que se atribuye a la concentración de ácido glutámico utilizado en la mezcla de reacción, así como el tiempo de reacción.

ABSTRACT

Hydroxyapatite nanofibers were synthesized by the hydrothermal microwave assisted method at 170 °C using a mixture of CaNO₃, KOH, K₂HPO₄ and glutamic acid as precursors. The reaction took place inside of the pressurized quartz vessels at 80 bars. The reaction time was varied from 15 up to 45 minutes; meanwhile temperature, microwave power, and precursor composition were kept constant. Crystal phase composition, functional groups, vibrational modes, surface morphology and nanostructure were studied by X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, Scanning Electron Microscopy and High Resolution Transmission Electron Microscopy, respectively. Hydroxyapatite nanofibers, with diameters in the order of nanometers and lengths of micrometers, were obtained; their surface seems to be smooth with well-defined shapes and edges. The length increased as the reaction time, so fibers as long as 70 μm were obtained with a diameter the order of 450 nm. According to the XRD patterns, preferential crystalline orientations in the [211] and [300] directions was observed, which are attributed to the glutamic acid concentration used in the reacting mixture as well as the reaction time.

INDICE

<i>I. INTRODUCCION</i>	6
<i>II. ANTECEDENTES</i>	8
<i>III. JUSTIFICACION</i>	9
<i>IV. OBJETIVO GENERAL</i>	10
<i>IV.1 OBJETIVOS PARTICULARES</i>	11
<i>CAPITULO 1 : MARCO TEORICO</i>	12
<i>1.1 BIOMATERIAL</i>	12
<i>1.1.1 Biomateriales Poliméricos</i>	13
<i>1.1.2 Biomateriales Metálicos</i>	14
<i>1.1.3 Biomateriales Cerámicos</i>	15
<i>1.2 TEJIDO OSEO</i>	16
<i>1.2.1 Matriz orgánica</i>	19
<i>1.2.2 Fase Mineral</i>	19
<i>1.3 HIDROXIAPATITA</i>	20
<i>1.3.2 Biocompatibilidad de la hidroxiapatita</i>	24
<i>1.3.2 Métodos de síntesis para la obtención de HAp</i>	26
<i>1.3.3 Síntesis hidrotermal asistida por microondas</i>	28
<i>1.3.3.1 Rotación Dipolar</i>	29
<i>1.3.3.2 Conducción Iónica</i>	31

1.3.3.3 <i>Ventajas del calentamiento por microondas</i>	32
1.4 TECNICAS DE CARACTERIZACION	34
1.4.1 <i>Difracción de Rayos X (DRX)</i>	34
1.4.1.1 <i>Tamaño de cristalito</i>	35
1.4.2 <i>Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)</i>	36
1.4.3 <i>Espectroscopia Raman</i>	37
1.4.4 <i>Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)</i>	39
1.4.5 <i>Espectroscopia de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS)</i>	40
1.4.6 <i>Microscopia Electrónica de Transmisión</i>	41
CAPITULO 2 : METODOLOGIA EXPERIMENTAL	42
CAPITULO 3 : RESULTADOS	46
3.1 <i>DIFRACCION DE RAYOS X (DRX)</i>	46
3.2 <i>ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER</i>	50
3.3 <i>ESPECTROSCOPIA RAMAN</i>	53
3.3 <i>MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (MEB)</i>	56
3.3 <i>MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION (MET)</i>	58
3.3 <i>ESPECTROSCOPIA POR DISPERSIÓN DE ENERGÍA (EDS)</i>	62
CONCLUSIONES	64
V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	65

I. INTRODUCCION

La naturaleza es una fuente muy importante de inspiración en el desarrollo de nuevos materiales para implante. En este sentido, el diseño de biomateriales se basa en la imitación de la estructura y función de los sistemas biológicos. El enfoque de la biomimética se basa en el hecho de que después de millones de años de evolución, la naturaleza ha aprendido qué sistemas son los más apropiados en términos de optimizar sus propiedades con el mínimo de recursos [1,2].

La ciencia de los materiales biomiméticos es un campo en evolución que estudia cómo la naturaleza diseña procesos de ensamble/desensamble construyendo bloques de moléculas para fabricar minerales de alto rendimiento, polímeros, compuestos mineral-polímero (por ejemplo, huesos, dientes) y materiales suaves (por ejemplo, piel, cartílago, tendones), y entonces aplicar estos diseños y procesos a la ingeniería de nuevas moléculas y materiales con propiedades únicas [3]. El punto de vista primordial de la ciencia de los biomateriales es la fabricación de materiales nanoestructurados que se asemejen a las complejas estructuras jerárquicas de los tejidos duros presentes en huesos y dientes.

El hueso se forma por una serie de procesos de biomineralización, una secuencia de reacciones físico-químicas que dan lugar a nanocompuestos orgánicos-inorgánicos con propiedades mecánicas excepcionales que sería imposible de alcanzar con materiales puros [2]. Este tejido consta de un componente celular y una matriz extracelular que consiste en una fase orgánica, principalmente colágeno tipo I y una fase inorgánica cerámica de nanocristales de hidroxiapatita carbonatada deficiente en calcio (CHA) [4]. Las principales características de las apatitas biológicas son: composición variable, cristales de tamaño nanométrico, deficiencia de calcio, presencia de grupos carbonato y desorden estructural. Otra importante característica de la estructura de la apatita es su capacidad para acomodar diferentes iones en sus tres subredes iónicas (calcio, fosfato e hidroxilo) [4]. Estos nanocristales de apatita crecen debido a la mineralización de sitios de moléculas de colágeno en el hueso.

La cristalización de apatita similar al hueso se produce a través de la nucleación de precursores de fosfato cálcico (CaP), como el fosfato de calcio amorfo (ACP) o fosfato de octacalcio (OCP) [5,6]. Estos precursores posteriormente se convierten en hidroxipatita deficiente en calcio (CDHA) mediante la incorporación de iones CO_3^{2-} , OH^- , OH^{2+} , PO_4^{3-} , etc.

El hueso exhibe propiedades físicas y mecánicas que son bastante inusuales. Es capaz de soportar cargas pesadas y flexionarse sin fracturarse dentro de ciertos límites. Además el hueso también actúa como un ion amortiguador para los cationes y aniones. Desde el punto de vista de los materiales el hueso puede ser simplificado como un material formado por tres fases: fibras orgánicas, una fase nanocristalina inorgánica y una matriz ósea. Sus propiedades mecánicas y físicas son consecuencia directa de las interacciones moleculares y atómicas dentro de este material compuesto natural. En la figura 1 se observa la secuencia de la estructura del hueso hasta llegar a su nanoestructura que es la parte central de este trabajo.

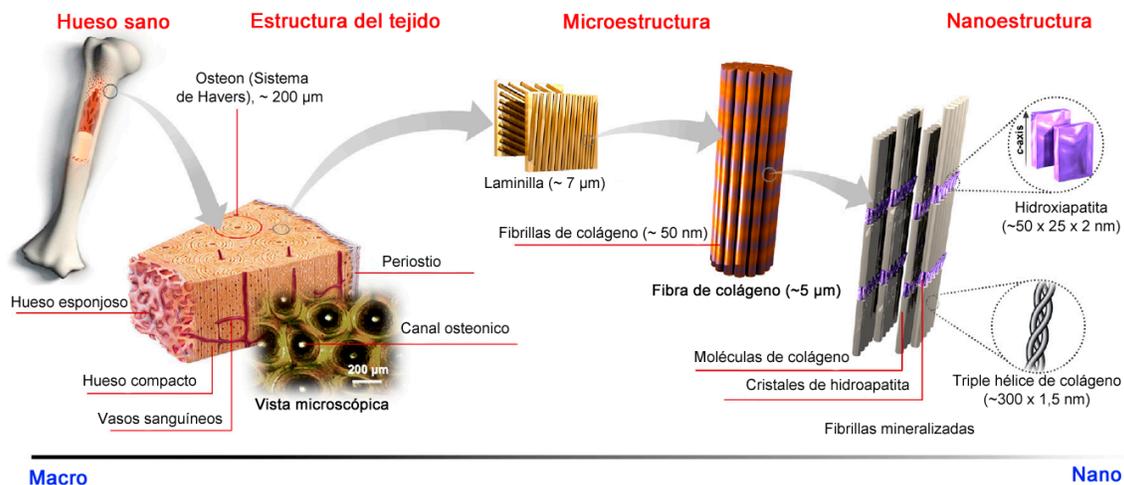


Figura 1. Naturaleza del material compuesto inorgánico-orgánico [4]

El hueso no es uniformemente denso, ya que debido a su naturaleza de ser un material orgánico-inorgánico puede adoptar diferentes disposiciones estructurales dependiendo de su ubicación en el esqueleto. La mayoría de los huesos presentan una capa exterior relativamente densa, conocida como cortical o hueso compacto que rodea una capa de

hueso denominada trabecular que es poroso y menos densa que a su vez está llena con tejido gelatinoso conocido como medula ósea [7]. El hueso cumple funciones críticas en términos de un material estructural y un depósito de iones. Ambas funciones dependen fuertemente del tamaño, forma, composición química y estructura cristalina de la fase mineral, y también de la distribución de minerales dentro de la matriz orgánica.

II. ANTECEDENTES

La utilización de materiales para ser usados como implantes dentro del cuerpo humano se remonta a más de 2000 años donde se utilizaba la implantación para sustituir tejido dañado. A mediados del siglo XIX se intentaron reparaciones de algunas partes del cuerpo humano con el avance tecnológico de esa época, sin embargo los principales materiales utilizados era cobre y bronce, los cuales sufrían corrosión dentro del organismo y causaban daños a los tejidos.

En el año 1829 H. S. Levert realizó las primeras pruebas para probar la compatibilidad biológica de materiales para implantes, ensayó con materiales como plata, oro y platino. Años después en 1886 se emplearon por primera vez placas metálicas para facilitar la reparación de fracturas de huesos. Ya en el siglo XX se comenzó a trabajar con aceros inoxidable que eran materiales resistentes a la corrosión y eran adecuados para dispositivos ortopédicos [8].

Después de la Segunda Guerra Mundial se comenzó a experimentar con copas de acrílico para reemplazar articulaciones de cadera, pero con el tiempo se demostró que este material era demasiado débil, por lo que era necesario estudiar y mejorar las propiedades de las aleaciones metálicas para ser utilizadas como prótesis. Por lo tanto a principios de la década del 50 se desarrollaron aleaciones metálicas a base de titanio, el cual es un material que se sigue utilizando hoy en día. En esa misma década se comenzó con la utilización del Teflón como un nuevo material para ser utilizado como remplazo de cadera. En la década del 70 se inicia con el desarrollo de materiales porosos para asegurar el crecimiento del hueso alrededor del implante, con todos estos avances, en las décadas siguientes se comienzan a mejorar los materiales y las técnicas quirúrgicas [8].

Los avances en la química de polímeros y el desarrollo de nuevas aleaciones metálicas han generado el desarrollo de nuevos materiales para ser implantados dentro y fuera del organismo. Por otra parte en el área de materiales cerámicos existe un gran interés debido a que se han podido obtener materiales con muy buenas propiedades químicas, físicas y mecánicas por lo que los convierte en una excelente opción para ser usados como materiales sustitutos en odontología y ortopedia.

III. JUSTIFICACION

Como se fundamentó anteriormente la hidroxiapatita es un compuesto mineral de alto interés para aplicaciones biomédicas debido a que representa casi el 90% del calcio corporal y el 80% del fósforo total. Su importancia en este tipo de aplicaciones se debe principalmente a su similitud, en cuanto a composición química, a la del componente inorgánico del hueso natural, además de que presenta una alta biocompatibilidad, resistencia a la compresión, resistencia a la corrosión, baja conductividad térmica, etc. Por otra parte la hidroxiapatita es una de las únicas fases de fosfato de calcio que es químicamente estable a la temperatura y pH del cuerpo humano (37°C y 7 respectivamente).

La hidroxiapatita se considera como un material idóneo para ser utilizado como sustituto de hueso, ya que posee propiedades favorables como biocompatibilidad, bioactividad, osteointegración, osteoinducción y excelentes propiedades mecánicas.

Como la principal aplicación de la hidroxiapatita es como un material para trasplante óseo es muy importante que cumpla con las exigentes pruebas mecánicas ya que como material sustituto de hueso debe ser capaz de soportar esfuerzos de compresión y flexión conservando siempre su estabilidad. Por lo tanto el proceso de síntesis de este material debe priorizar la mejora de dichas propiedades mecánicas por lo que es muy importante controlar los parámetros que puedan afectar sus propiedades finales.

Como se mencionó en la fundamentación teórica se puede deducir que las mejores propiedades mecánicas de la hidroxiapatita se encuentra en la dirección “z” de su estructura atómica ya que es donde se observa un apilamiento más compacto de los átomos de calcio tipo I, por lo tanto es importante que en el material que se va a sintetizar

se obtenga una dirección preferencial de crecimiento en el eje “z” de la estructura. Recientemente se ha encontrado que al sintetizar hidroxiapatita por métodos hidrotermales asistidos por microondas se obtiene un mayor control de la morfología y orientación de las estructuras [8].

El uso de un método hidrotermal asistido por microondas para la síntesis de hidroxiapatita se debe a que en este método la energía se transfiere directamente al material a nivel molecular con el campo electromagnético, a diferencia del método convencional donde la transferencia de energía se hace por medio de conducción y convección en donde solo se generan gradientes de temperatura. Además el empleo de microondas reduce significativamente el tiempo de procesado del material respecto a las síntesis convencionales, y lo más importante es que permite el control de la orientación cristalina (dirección “z”) que se refleja en una mejora de sus propiedades mecánicas.

Por último la justificación de este proyecto es que se parte de resultados obtenidos previamente por el grupo de trabajo con el que se va a colaborar, los cuales han trabajado en síntesis y caracterización de nanoestructuras de hidroxiapatita controlando su morfología, dimensiones y orientación cristalina por medio del método de microondas, teniendo éxito en la obtención de nanofibras, nanoplacas y nanoalambres de hidroxiapatita.

IV. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es emplear las herramientas de la síntesis química de materiales para la obtención de nanoestructuras, en particular nanofibras de hidroxiapatita mediante el método de microondas. Así mismo se pretenden encontrar los parámetros de reproducibilidad del proceso de síntesis y llevar a cabo la caracterización de nuestro material mediante diferentes técnicas que nos permitan analizar y estudiar el comportamiento de dicho material bajo distintos parámetros de síntesis.

IV.I OBJETIVOS PARTICULARES

- Sintetizar nanofibras de hidroxiapatita utilizando métodos hidrotermales asistidos por microondas, teniendo un control sobre su morfología,

dimensiones y orientación cristalina preferencialmente en la dirección “z” de la estructura.

- Encontrar los parámetros óptimos de las variables físicas y químicas durante el proceso de síntesis para obtener reproducibilidad de las nanoestructuras.
- Caracterizar la estructura de las nanofibras mediante Difracción de Rayos X (DRX) para identificar las fases minerales presentes y la orientación cristalina.
- Realizar medidas de absorción atómica y/o fluorescencia de rayos X para cuantificar la relación Ca/P presente en las nanofibras y que se aproxime a la relación Ca/P encontrada en el hueso humano.
- Estudiar la morfología y microestructura de las nanofibras mediante Microscopia Electrónica de Alta Resolución (HREM) y así poder generar modelos sobre cómo se está llevando a cabo el proceso de crecimiento del cristal.
- Profundizar en el estudio de la estructura cristalina del material mediante la técnica de Difracción de Electrones de área selecta, la cual nos será útil para analizar el arreglo cristalino en sitios localizados de la muestra y poder determinar las posibles orientaciones cristalinas preferenciales del material.
- Realizar medidas de Microscopia Electrónica de Transmisión de campo oscuro para relacionar la orientación cristalina con sitios específicos de las nanofibras.
- Utilizar la técnica de contraste z derivada de la microscopia electrónica para observar cómo se distribuye la composición química en las nanofibras.
- Utilizar las nanofibras obtenidas para fabricar un biomaterial añadiendo la fase orgánica y que pueda ser aplicado como material de implante en tejido óseo.

CAPITULO 1 : MARCO TEORICO

1.1 BIOMATERIAL

Existen muchas formas para definir un biomaterial; una de ellas fue propuesta durante el “6th Anual International Biomaterials Symposium” en 1974: “*un biomaterial es una sustancia sistémica y farmacológicamente inerte diseñada para la implantación dentro, o incorporación a, un sistema vivo*” [9]. Un biomaterial implantable es aquel que se encuentra en contacto continuo o intermitente con el líquido extracelular, en esta categoría se encuentran la mayoría de los materiales dentales. Otra definición de biomaterial fue propuesta en la “European Society for Biomaterials Consensus Conference” en 1986: “*biomaterial es un material o sustancia, utilizado sólo o en la fabricación de un dispositivo médico encaminado a interactuar con los tejidos humanos para monitorear funciones del cuerpo o para tratar condiciones patológicas del mismo*” [10,11]

Los biomateriales deben cumplir con las condiciones de partida de ser biocompatibles y asegurar una determinada vida media. A su vez, tienen que aportar las prestaciones específicas que requiera la aplicación a que vayan destinados. Durante el último tercio del siglo XX los biomateriales eran esencialmente materiales industriales seleccionados con el criterio de que fueran capaces de cumplir ciertos requisitos de aceptabilidad biológica. Sin embargo hoy en día muchos biomateriales son diseñados, sintetizados y procesados con el único fin de tener una aplicación en el campo médico.

A los biomateriales (materiales implantados intracorporalmente) se les exige que lleven a cabo una función dada y no ocasionen ningún daño al organismo. Entre sus características es imprescindible que sean *biocompatibles*, esto es, biológicamente aceptables. Estos materiales deben permanecer en contacto con los tejidos vivos, por lo que es muy importante que posean una buena biocompatibilidad, es decir, que no se produzcan reacciones no deseadas en la interfaz tejido-material. Un material biocompatible se considera “inerte” cuando no existe reacción con el tejido y además el material permanece estable durante intervalos indefinidos de tiempo. Por otra parte se considera “bioactivo” cuando hay interacciones específicas con el tejido que lo rodea,

cuando un material se disuelve dentro del organismo por una actividad celular se considera “bioabsorbible” y finalmente se considera “biodegradable si el material falla gradualmente debido a una actividad biológica específica [10, 12]. Debido a la naturaleza del material artificial con el que se fabrica un implante, se puede establecer una clasificación en materiales *cerámicos, metálicos, poliméricos o materiales compuestos*.

1.1.1 Biomateriales Poliméricos

Son ampliamente utilizados debido a la variedad de compuestos que presentan y ofrecen la posibilidad de fabricarlos de distintas maneras, con características bien determinadas y con facilidad de conformarlos en fibras, tejidos, películas o bloques.

Pueden ser tanto naturales como sintéticos y, en cualquier caso, se pueden encontrar formulaciones bioestables con carácter permanente, particularmente útiles, para sustituir parcial o totalmente tejidos u órganos lesionados o destruidos. Tienen las características de ser mas blandos que los metales y ser mejores aislantes que las cerámicas pero tienen la desventaja de ofrecer poca resistencia a la temperatura [13].

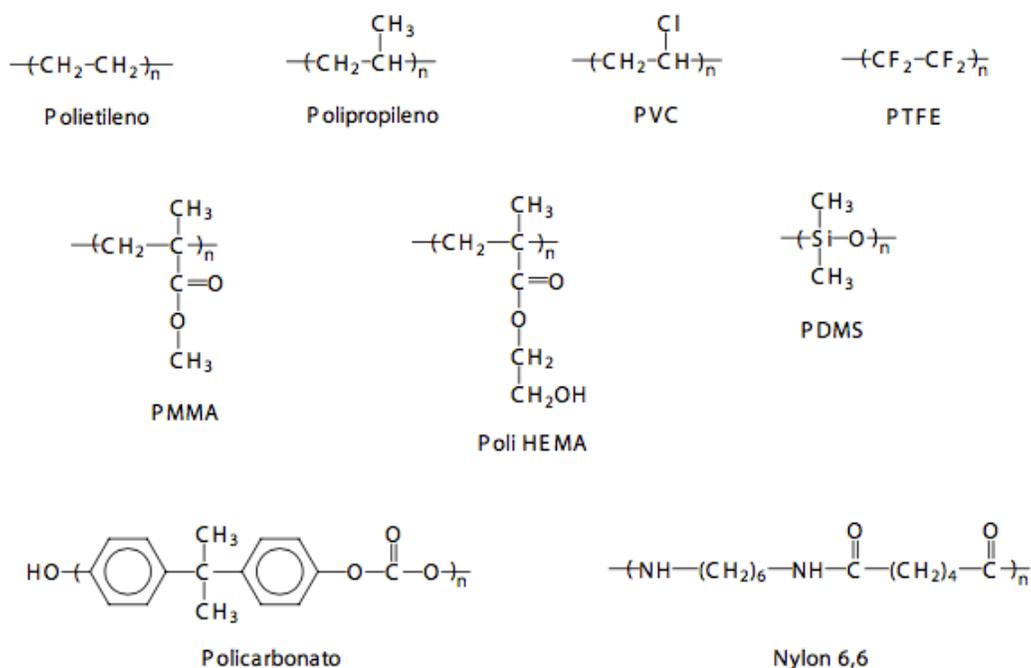


Figura 2. Estructura química de algunos polímeros empleados como biomateriales [13]

1.1.2 Biomateriales Metálicos

El número de elementos metálicos que se utilizan en la fabricación de implantes es muy limitado. El primer requisito para su utilización es que sean tolerados por el organismo, por lo que es muy importante la dosis que puedan aportar a los tejidos vivos. Otro requisito muy importante es que tengan una buena resistencia a la corrosión. La corrosión es un problema general de los metales, más aun si están inmersos en un medio hostil como es el organismo humano, y a temperaturas del orden de 37 °C. Sin embargo algunos metales se escapan a este problema, como son los metales preciosos, otros como el titanio forman una capa de óxido en sus superficie protegiendo el interior del metal y evitando que avance la corrosión.

Los metales y aleaciones tienen muchas aplicaciones en ortopedia, especialmente como materiales estructurales para la fijación de fracturas y en sustituciones parciales o totales de articulaciones, su gran uso se debe a sus excelentes propiedades mecánicas ya que pueden soportar grandes cargas. Los materiales metálicos más utilizados como implantes son los aceros inoxidable, las aleaciones cobalto – cromo y el titanio. Existen muchas aplicaciones donde se utilizan estos materiales, sin embargo son muy pocos los materiales metálicos que pueden resistir el ambiente agresivo del organismo, además de que no todos los materiales dan resultados satisfactorios al momento de ser implantados, ya que en ocasiones pueden sufrir desgaste, corrosión o liberación de especies químicas al organismo [13].



Figura 3. Prótesis dental fabricada en una aleación de paladio [13]

1.1.3 Biomateriales Cerámicos

Los biomateriales cerámicos poseen una baja reactividad química, por tanto, su carácter inerte, conlleva una clara biocompatibilidad. Pero no todas las biocerámicas son inertes y, de hecho, muchos materiales cerámicos que se utilizan en cirugía reconstructiva son bioactivos. Las biocerámicas podrían ser los biomateriales ideales, ya que poseen una buena biocompatibilidad y oseointegración y, a su vez, son los materiales más parecidos al componente mineral del hueso. Las primeras cerámicas que fueron utilizadas en aplicaciones médicas, la alúmina y la zirconia, son dos prototipos de cerámicas conocidas como inertes, razón por la que fueron elegidas como implantes [13]. A estas cerámicas las caracteriza una cinética de reacción muy lenta, tanto que se les puede considerar como cerámicas “casi inertes”. Como en cualquier reacción química, el producto de reacción de una sustancia con su entorno puede conducir a un resultado no favorable, como es la corrosión en un metal, pero puede también conducir a un producto de reacción favorable que transforme químicamente el producto de partida en el producto final deseado. Este es el caso de las cerámicas bioactivas que, en contacto con los fluidos fisiológicos, reaccionan químicamente en la dirección de producir hueso neoformado.

El fosfato de calcio más utilizado en la fabricación de implantes es la hidroxiapatita, por ser el compuesto más parecido al componente mineral de los huesos, presenta buenas propiedades como biomaterial, tales como biocompatibilidad, bioactividad, osteoconductividad y unión directa al hueso. Además la hidroxiapatita es un material bioactivo que genera un enlace químico entre el hueso y el implante por lo que es un material ideal para ser utilizado como relleno en defectos óseos.



Figura 4. Prótesis ocular fabricada con hidroxiapatita [13]

1.2 TEJIDO OSEO

El tejido óseo, denominado comúnmente hueso, forma la base o sostén del sistema locomotor. Gracias a la presencia de los huesos y su disposición en el espacio, el ser humano conserva su forma y puede adoptar diversas posturas. Los huesos también cumplen otras funciones, por ejemplo, sirven para alojar y proteger a tejidos y órganos vitales. En los huesos además se insertan los músculos a través de tendones o directamente sobre la superficie ósea, generalmente dos o más huesos se relacionan entre sí por la inserción de un musculo común. La acción de contracción y relajación funciona como palanca que permite el movimiento entre un conjunto de huesos vecinos, movimiento facilitado por las articulaciones que los unen [14].

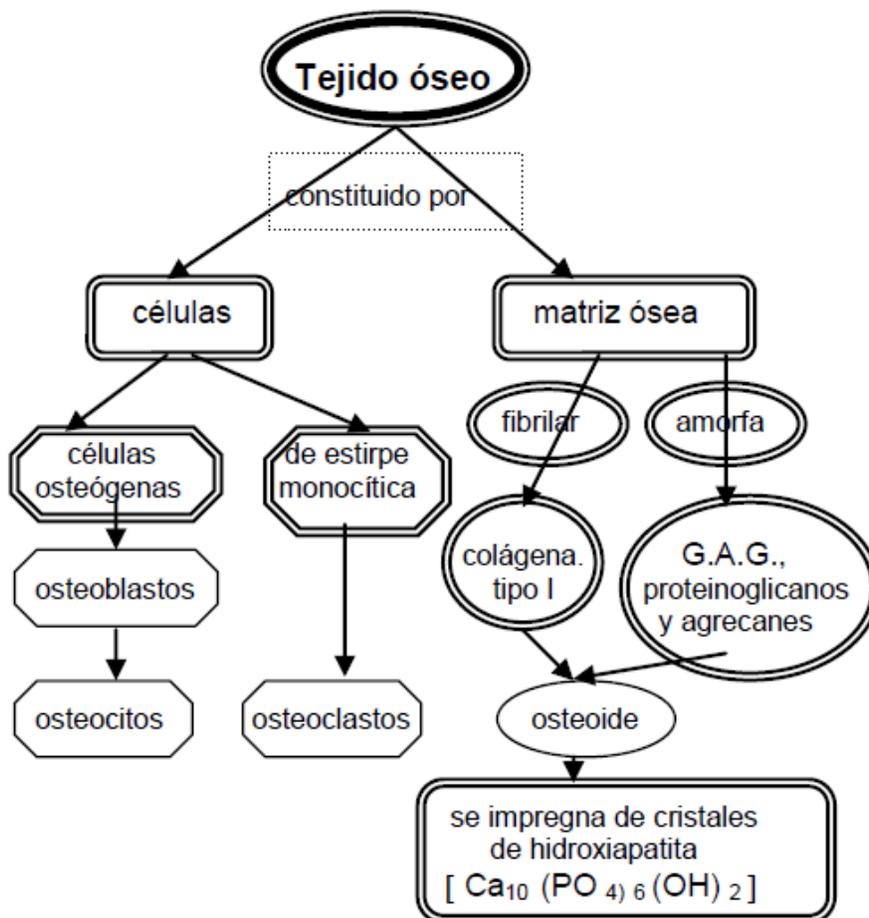


Figura 5. Componentes del tejido óseo [14]

Desde un punto de vista histológico, el hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada. La disposición de estas laminillas es la que determina que el hueso sea cortical o esponjoso. El hueso cortical o compacto se estructura en conductos de Havers recubiertos de laminillas en disposición concéntrica donde se sitúan los osteocitos. El hueso esponjoso o trabecular lo constituyen laminillas óseas en forma de red que delimitan cavidades en cuyo interior se encuentra medula ósea [15].

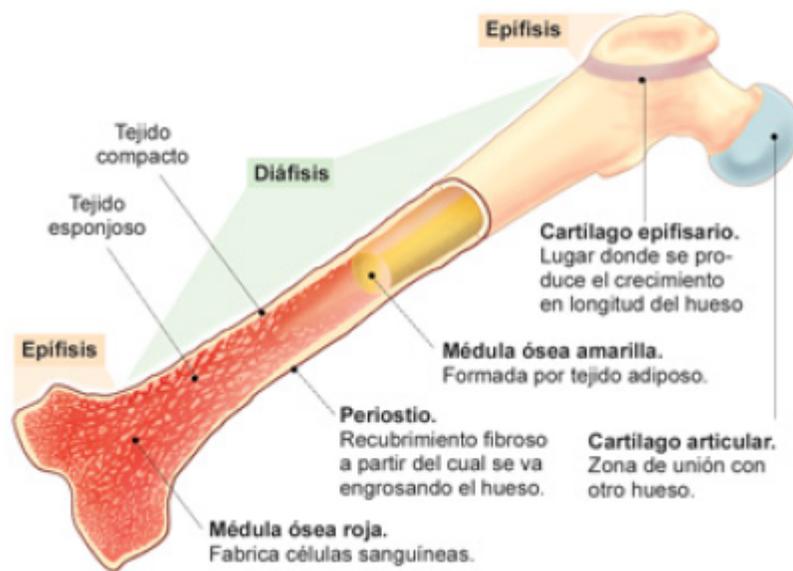


Figura 6. Estructura de un hueso [15]

El tejido óseo es un tejido duro, de consistencia rígida. Está constituido por células y por una matriz ósea, sustancia intercelular calcificada, integrada por componentes orgánicos: amorfo y fibrilar e inorgánicos: sales de calcio y fosforo [14]. 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 7) y se muestra una tabla que desglosa los componentes de la matriz ósea.

El hueso natural es un material compuesto proteína – mineral que contiene plaquetas minerales de tamaño nanométrico (esencialmente hidroxiapatita carbonatada), proteínas (colágeno tipo I) y agua (Fratzl et al., 2004). La fase mineral es rígida y quebradiza mientras que la proteína es mucho mas suave y resistente, por lo que el material compuesto combina las propiedades óptimas de rigidez y dureza de ambos materiales, esta combinación de propiedades le proporciona al hueso tanto rigidez como resistencia a la fractura.

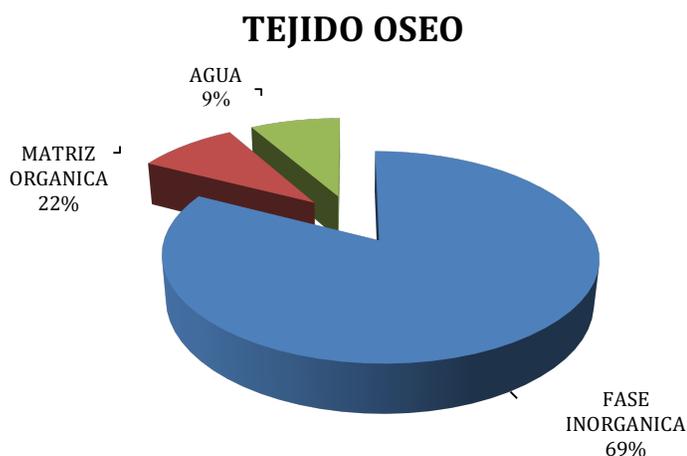


Figura 7. Composición del tejido óseo [16]

Componente	% en peso	% en volumen
Mineral	70	45
Hidroxiapatita carbonatada, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (*) (~80%)		
Carbonatos de calcio (~15%)	M	
Otras sales minerales (~5%)		
Orgánico	20	33
Colágeno tipo I (~90%)		
Glicoproteínas	M	
Fosfoproteínas		
Proteoglicanos		
Osteonectina		
proteína Gla ósea (osteocalcina)		
Proteína Gla de la matriz (con ácido γ -carboxiglutámico)		
Osteopontina		
Proteína morfogenética ósea (BMP)		
Agua	10	22

M = componente mayoritario.

(*) La hidroxiapatita carbonatada contiene dentro de su estructura cristalina el grupo carbonato

CO_3^{2-} así como otros iones que sustituyen al calcio y al grupo OH^- .

Tabla 1. Componentes de la matriz ósea [16]

1.2.1 Matriz orgánica

La matriz orgánica o sustancia osteoide representa un tercio del peso óseo. Está formada fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca el colágeno (90%). La matriz juega un papel importante en el conjunto del sistema óseo, siendo evidente este hecho cuando aparecen enfermedades del colágeno como la osteogénesis imperfecta. Sin embargo actualmente debe considerarse a la matriz mineralizada extracelular como algo más que un reservorio de calcio y fósforo, ya que constituye una reserva de proteínas que participan en la regulación de la diferenciación celular y en la integridad y función del tejido óseo [17]. La fase orgánica también contiene otras proteínas no colágenas como componentes menores del tejido dado que constituyen el 10% del total, indispensables para el desarrollo, el crecimiento, el remodelado y la reparación del hueso.

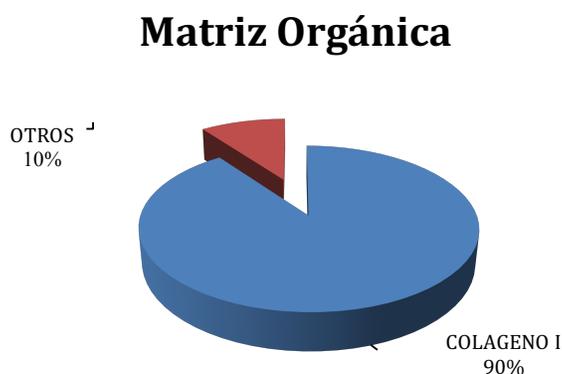


Figura 8. Composición de la matriz orgánica [16]

1.2.2 Fase Mineral

El componente mineral del hueso representa el 65% del peso óseo. Está formado por calcio, fósforo y carbonato (en proporciones 10:6:1) en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ y, en menor proporción hay magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. El plasma se encuentra sobresaturado de calcio y fósforo respecto a la hidroxiapatita, por lo que debe haber sustancias que inhiban la mineralización. Las proteínas con capacidad adhesiva favorecen la mineralización, mientras que los proteoglicanos, magnesio, ATP y pirofosfato la inhiben.

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

Tabla 2. Comparación en la composición de hidroxiapatita biológica y sintética [16]

1.3 HIDROXIAPATITA

La hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ es una forma de fosfato que tiene una gran cantidad de aplicaciones tales como la separación y la purificación de proteínas y los implantes de hueso. Para cada aplicación, el uso de las materias primas de calcio es optimizado especificando las propiedades físicas y químicas tales como: la geometría, la dimensión, la densidad, el tamaño del poro, la fuerza mecánica, la pureza y la fase química del material.

La hidroxiapatita es un compuesto cristalino integrado por tres moléculas de fosfato de calcio y de una molécula de hidróxido de calcio. El concentrado de la hidroxiapatita es la matriz de calcio de la proteína encontrada en el hueso sin procesar. Esta sustancia natural contiene aproximadamente 14% la proteína del colágeno y 4% de otras proteínas y aminoácidos pequeños (sobre todo hidroxiprolina, glicina y ácido glutámico). El calcio abarca entre el 24 – 30 % de la matriz de la hidroxiapatita y junto con varios minerales (zinc, potasio, silicio, manganeso, hierro) forman un conjunto biodisponible activo de calcio.

Las cirugías ortopédicas comunes ahora exigen una cantidad grande de substitutos bioactivos de hueso con una variedad de respuestas osteogénicas. En el sistema de fosfato de calcio, la hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ y el fosfato tricálcico $Ca_3(PO_4)_2$ son excelentes materiales bioactivos convenientes para el prótesis duro del tejido fino.

Los minerales del grupo de la apatita son un grupo de fosfatos, arsénicos y vanadatos que tienen estructuras hexagonales o monoclinicas pseudo-hexagonales muy similares. Este grupo incluye varios minerales tales como la apatita, mimetita, piromorfita y vanadinita. Apatita es el nombre general para los minerales: clorapatita, fluorapatita e hidroxiapatita [18].

En la estructura cristalina de la hidroxiapatita se diferencian dos tipos de calcio, esto se debe a que se encuentran rodeados de un número distinto de oxígenos en la estructura de la apatita. Por su parte el fósforo se encuentra rodeado por 4 oxígenos y forma un tetraedro que es característico del grupo fosfato PO_4^{-3} . Por último el grupo OH^{-1} tiene una densidad de carga con simetría casi esférica. La estructura cristalina de la hidroxiapatita se obtiene ensamblando todos los elementos anteriormente mencionados [16].

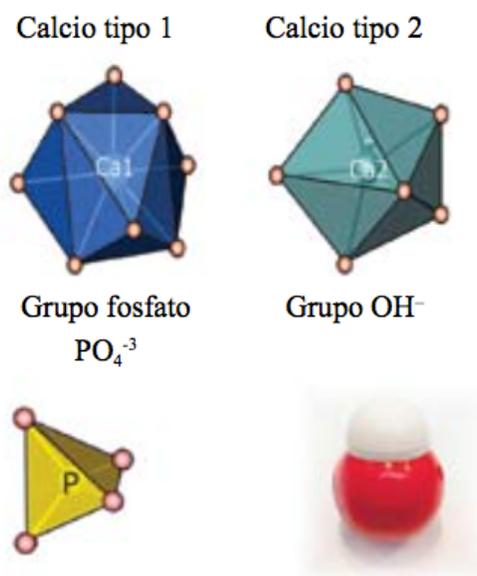


Figura 9. Elementos que forman la estructura cristalina de la hidroxiapatita [16]

Para formar la estructura cristalina, los grupos OH^{-1} se colocan desordenadamente hacia arriba y hacia abajo en una columna a lo largo del eje de un cilindro, sobre la superficie del cilindro se tiene un arreglo hexagonal de oxígenos. Los átomos de calcio tipo 2 están ubicados un poco desplazados del centro de cada hexágono. Los 7 aniones mas cercanos al calcio tipo 2 que forman la bipirámide pentagonal son: el oxígeno del grupo OH^{-1} que se encuentra en el eje del cilindro, cuatro oxígenos que forman parte de la malla hexagonal, y otros dos mas que se encuentran fuera del cuerpo del cilindro. Los tetraedros PO_4^{-3} se colocan de tal manera que cada uno de ellos une dos bipirámides pentagonales de calcio tipo 2 compartiendo una arista con una y un vértice con la otra. Los calcios tipo 1, como se mencionó anteriormente, forman prismas triangulares triapuntados. Estos prismas se ubican en la estructura de la hidroxiapatita de tal manera que se apilan uno sobre otro compartiendo las caras que son las tapas del prisma triangular [16].

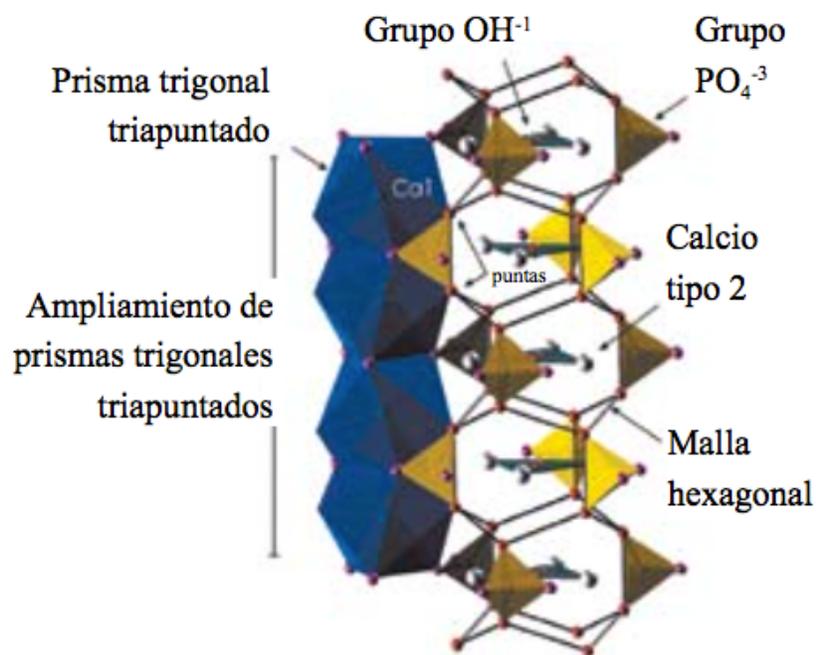


Figura 10. Estructura cristalina de la hidroxiapatita [16]

El estudio de la hidroxiapatita se ha realizado desde hace varias décadas; Aaron y Posner (1958) propusieron su estructura cristalina a partir del análisis de un monocristal. El carácter iónico de la hidroxiapatita la hace una cerámica dura, refractaria, con punto de fusión mayor a 1500 °C. Además este carácter iónico le proporciona la capacidad de la sustitución parcial o completa de iones de la red por otros de tamaño similar (PO_4^{3-} por HPO_4^{2-} , Ca^{2+} por K^+ o Mg^{2+} , OH^- por F^- , Cl^-) [19] y le proporciona su propiedad de insolubilidad. La relación ideal Ca/P es 10:6, su densidad calculada es de $3.219g/cm^3$ y sus propiedades mecánicas varían de acuerdo con el proceso de manufactura; la hidroxiapatita policristalina tiene un módulo elástico alto, 40 – 117 Gpa [20]. La hidroxiapatita natural tiene una estructura cristalina hexagonal con grupo espacial $P6_3/m$ y sus parámetros de red a y c son 9.423 \AA y 6.883 \AA respectivamente (Posner *et al.*, 1958).

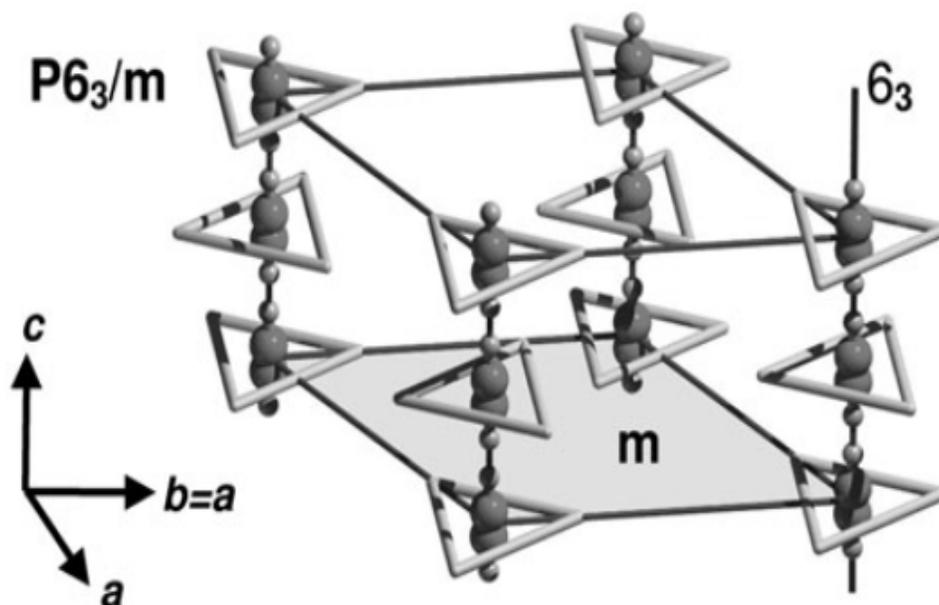


Figura 11. Estructura hexagonal de la hidroxiapatita $P6_3/m$

La hidroxiapatita permanece estable hasta 1200 °C bajo condiciones normales de presión y temperatura, paulatinamente va perdiendo los iones hidroxilo conforme pasa el tiempo. Las posiciones calculadas de los átomos dentro de la celda unitaria se muestran en la tabla 3.

ÁTOMO	ÁTOMOS POR CELDA UNITARIA	X	Y	Z
Ca(I)	4	0.333	0.667	0.666
Ca(II)	6	0.246	0.993	0.328
P	6	0.400	0.369	0.192
O(I)	6	0.329	0.484	0.295
O(II)	6	0.589	0.466	0.496
O(III)	12	0.348	0.259	0.632
OH	2	0.000	0.000	0.875

Tabla 3. Posiciones de los átomos dentro de la celda unitaria de la hidroxiapatita [21]

1.3.1 BIOCMPATIBILIDAD DE LA HIDROXIAPATITA

La biocompatibilidad de los fosfatos de calcio y de la hidroxiapatita sintética no solo se debe a su composición sino también a los resultados que se han obtenido en su implantación *in vivo*, los cuales han demostrado la ausencia de toxicidad local o sistémica, no provocando inflamación ni daño al organismo. Además la formación de enlaces internos entre la neoformación ósea y la hidroxiapatita es una gran ventaja para el uso de ésta como sustituto del tejido óseo.

Generalmente se ha observado que durante las primeras horas posteriores a la implantación, se produce una ligera fase inflamatoria. En este tiempo, varias células, incluyendo macrófagos, invaden el sitio quirúrgico, comienzan a fagocitar los residuos celulares inactivos y aparece el ataque a la superficie de las partículas de hidroxiapatita. Como resultado se obtiene la formación de una capa química de apatita cuya apariencia es similar a la apatita biológica.

Al mismo tiempo los preosteoblastos son programados para su conversión en osteoblastos y migran hacia el borde del defecto óseo así como a la superficie de las partículas de hidroxiapatita. Estos osteoblastos comienzan a depositar osteoide sobre la superficie de la hidroxiapatita y la revascularización se lleva a cabo a expensas del calcio y fosfato del sitio de implantación. La hidroxiapatita y la formación de osteoide actúan como sitios de nucleación epitaxial para la formación de apatita biológica. A las tres semanas la hidroxiapatita es revestida con fibroblastos y osteoblastos donde intervienen capas de mineralización osteoides. La formación de hueso continua hasta que el defecto es restaurado y sucesivamente es remodelado, disminuyendo el área de osteoides entre el hueso nuevo y las partículas de hidroxiapatita [22, 23].

Otra propiedad de la hidroxiapatita es que aparentemente no presenta reabsorción significativa. En ciertas aplicaciones, como en odontología, esto es una ventaja pero no así en las situaciones donde se requiere un implante que eventualmente pueda ser reabsorbido dejando espacio para ser ocupado por el hueso nuevo. Se ha encontrado que la velocidad de la biodegradación está en función de la microporosidad de una cerámica, las hidroxiapatitas muy densas o sin porosidad se degradan muy poco [24, 25]. La hidroxiapatita no exhibe propiedades osteoinductoras, pero si muestra osteoconducción cuando se implanta en defectos óseos. La formación del hueso comienza desde el borde del defecto y es conducido a través del implante formando un puente de hueso e hidroxiapatita. A pesar de que las propiedades mecánicas de la hidroxiapatita son similares a las del hueso duro, resulta aún muy frágil para ser utilizada como sustituto del tejido duro [26].

MATERIAL	RESISTENCIA A LA COMPRESIÓN (MPa)	RESISTENCIA A LA TRACCION (MPa)	MODULO DE ELASTICIDAD (GPa)
HUESO			
Duro ó Cortical	137.8	68.9	13.8
Trabecular ó Esponjoso	41.4	3.5	-----
FOSFATO DE CALCIO			
Denso	208.7 – 895.7	68.9 – 192.9	34.5 – 103.4
Poroso	6.9 – 68.9	2.48	-----

Tabla 4. Propiedades mecánicas de hueso y fosfato de calcio [26]

Sus propiedades mecánicas no permiten construir grandes piezas, sin embargo es muy utilizada para la reconstrucción ósea, reconstrucción maxilofacial y llenado de vacíos en tejidos óseos. La capacidad de la hidroxiapatita para promover el crecimiento óseo no depende solamente de su composición química sino también de la presencia de poros, mediante el aumento de la porosidad el área de contacto entre el tejido y el implante se incrementa con lo cual se reduce la concentración de esfuerzos en la interfase [27]. La microestructura también juega un papel muy importante en la degradación del material, ya que un material totalmente denso es más estable y en cambio uno más poroso es más degradable.

1.3.2 METODOS DE SINTESIS PARA LA OBTENCION DE HIDROXIAPATITA

El primer método de síntesis de hidroxiapatita fue descrito en 1851; Daubrée obtuvo hidroxiapatita por medio del uso de un flujo de vapor de un compuesto químico de fósforo y cloro (PCl_3) sobre cal viva. Desde entonces, diferentes métodos de síntesis han sido reportados, incluyendo síntesis en estado sólido a alta temperatura, síntesis en fase acuosa, métodos hidrotermales entre otros, así como métodos químicos, métodos sol-gel y métodos de recubrimientos de hidroxiapatita sobre diferentes sustratos por medio de spray con plasma, deposición electroquímica, crecimiento con sales fundidas, crecimiento con gel, etc. En alguno de estos métodos la reacción de síntesis toma lugar dentro de soluciones acuosas y el producto precipita al final de la reacción [28].

El método más común para la obtención de hidroxiapatita es el de precipitación [29] con el que se obtienen cantidades apreciables del material de forma económica y fácilmente reproducible. En este método, sin embargo, se debe controlar el pH, la temperatura de reacción, el tiempo de reacción, la atmósfera de tratamiento y la relación Ca/P de los reactivos, para impedir la aparición de otras fases como los ortofosfatos [30-32]. Una hidroxiapatita apropiada para cualquier aplicación debe controlar su composición, las impurezas, morfología, cristalinidad, tamaño del cristal y de las partículas. Las pequeñas variaciones en las anteriores características ocasionan diferentes comportamientos del material implantado, tanto es su bioactividad y rango de disolución como en su reabsorción [33].

Técnica	Materiales iniciales	Condiciones de síntesis	Observaciones
Síntesis en estado Sólido a altas temperaturas	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{CaCO}_3$ $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 + \text{CaCO}_3$	900 - 1300°C, usualmente con flujo de vapor de agua.	Ca/P = 1.67, gran tamaño de grano, formas irre- gulares e inhomo- géneos.
Síntesis en fase acuosa	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{H}_3\text{PO}_4$	T de reacción = 100°C pH: 7-12	Ca/P < 1.67 cristales irregulares pequeños con baja cristali- nidad.
Métodos hidrotérmicos	HAp preparada por vía húmeda, otros fosfatos de calcio, etc.	100-200°C, 1-2 MPa 300-600°C, 1-2 Kbar	Ca/P = 1.67 cristales de dife- rentes tamaños, homogéneos.
Crecimiento a partir de sales fundidas	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y CaF_2 , o CaCl_2	1650°C	Cristales grandes, deformaciones durante el crecimiento.
Crecimiento en geles	Gel + $\text{Ca}^{2+} + \text{PO}_4^{3-}$	pH: 7-10 T = 40, 60°C.	Se obtiene HAp, OCP, monetita y brushita.

Tabla 5. Técnicas de preparación de hidroxiapatita [16]

En la mayoría de los métodos en fase acuosa se obtienen diversas fases metaestables que no son fáciles de controlar; en los métodos que involucran reacciones en estado sólido a altas temperaturas se requieren gastos de energía considerables y se tiene poco control de la microestructura y por último si el método que utiliza materiales coralinos fuese empleado de manera industrial, el impacto que se tendría sobre los ecosistemas marinos sería considerable, pues las barreras coralinas regulan en gran medida los climas, temperaturas y cantidad de CO_2 disuelto en los mares [16].

1.3.3 SINTESIS HIDROTERMAL ASISTIDA POR MICROONDAS

Con el término *microondas* se identifica a las ondas electromagnéticas del espectro situadas entre la radiación infrarroja y las ondas de radio y cuya longitud de onda está comprendida entre 1 cm y 1 m (frecuencias desde 30 GHz a 300 MHz) (Figura 1.1). Los radares y telecomunicaciones utilizan unas longitudes de onda que abarcan desde 1 a 25 cm, y para evitar interferencias está regulado el uso de unas frecuencias u otras por acuerdo internacional. Principalmente y aunque depende de la zona, solo las frecuencias 2.45 GHz (12.2 cm) y 900 MHz (33.3 cm) están disponibles en Europa para calefacción dieléctrica microondas. Esta frecuencia indica el número de oscilaciones del campo electromagnético por segundo. Los hornos domésticos y los reactores microondas comerciales con fines químicos generalmente operan a 2.45 GHz y la gran mayoría de la literatura que concierne a la calefacción microondas están basados en experimentos realizados a esa frecuencia.

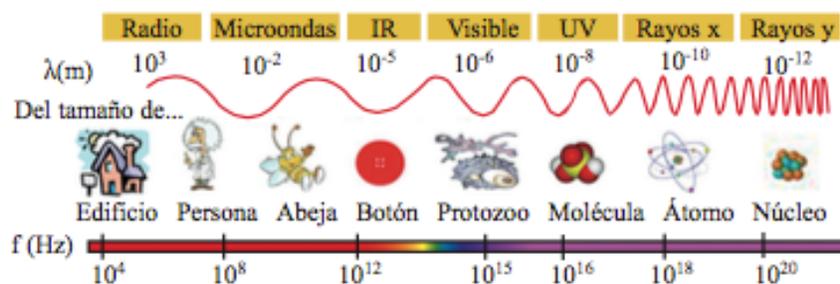


Figura 12. Espectro Electromagnético.

La radiación por microondas es una forma de energía electromagnética situada en el rango de frecuencias (300 - 300.000 MHz) correspondiente a una longitud de onda (1m - 1mm).

Al incidir sobre un cuerpo la radiación de tipo microondas, se ve afectada la rotación de las moléculas de la sustancia que lo forma, mientras que su estructura molecular se mantiene inalterable.

La energía microondas consiste en un campo eléctrico y un campo magnético, aunque solamente el campo eléctrico transfiere energía en forma de calor a la sustancia con la que dicha radiación entra en contacto [34].

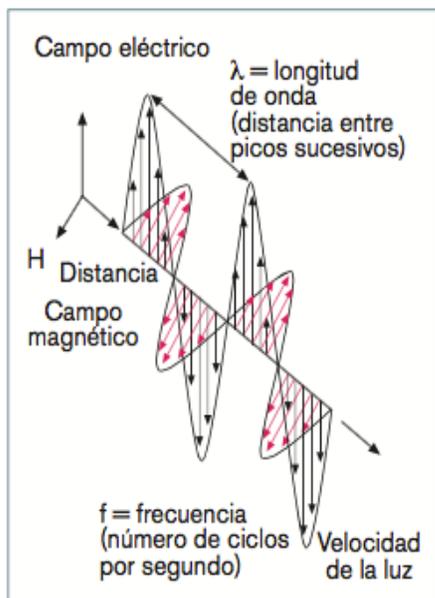


Figura 13. Propagación de la onda electromagnética.

Mientras que en un proceso convencional, por ejemplo empleando un baño de aceite, el calentamiento es dirigido a través de la sustancia pasando primero a través de las paredes del recipiente para finalmente llegar al disolvente y los reactivos, en el caso de la radiación microondas el acoplamiento con las moléculas se lleva a cabo directamente en el interior del medio, que puede ser un alimento, una disolución acuosa, o por extensión un determinado medio de reacción. Dado que el proceso no es dependiente de la conductividad térmica del recipiente del material, el resultado es un supercalentamiento localizado de forma instantánea. Los dos mecanismos de transferencia de energía de la radiación microondas para conseguir el calentamiento de la muestra son: la *rotación dipolar* y la *conducción iónica* [34].

1.3.3.1 Rotación Dipolar:

Para que un material pueda generar calor cuando es irradiado con microondas debe poseer un momento dipolar. Cuando éste material es expuesto a frecuencias microondas, los dipolos de la muestra se alinean según el campo eléctrico aplicado.

Como el campo aplicado oscila, los dipolos intentan alinearse con éste, y durante este proceso la energía se pierde en forma de calor mediante fricción molecular y pérdidas dieléctricas. La cantidad de calor generado es directamente proporcional a la habilidad de alinearse de los dipolos con el campo aplicado. Si los dipolos no tienen suficiente tiempo para alinearse o se reorientan demasiado rápido con el campo, la muestra no se calienta. A 2450 MHz el campo rota 4.9×10^9 veces por segundo y se encuentra situado entre estos dos extremos mencionados anteriormente, da tiempo a los dipolos para alinearse con el campo, pero no para seguir la alternancia de éste. De esta forma, se genera una diferencia de fase entre la orientación del campo y el dipolo. Esta diferencia de fase causa que la energía se pierda en forma de calor por fricciones o colisiones moleculares y por pérdidas dieléctricas dando lugar a la calefacción dieléctrica. Es preciso remarcar que la interacción entre la irradiación microondas y los líquidos polares ocurre cuando la frecuencia de la radiación es similar a la frecuencia del proceso de relajación rotacional y, por lo tanto, no es un fenómeno de resonancia de mecánica cuántica [35,36].

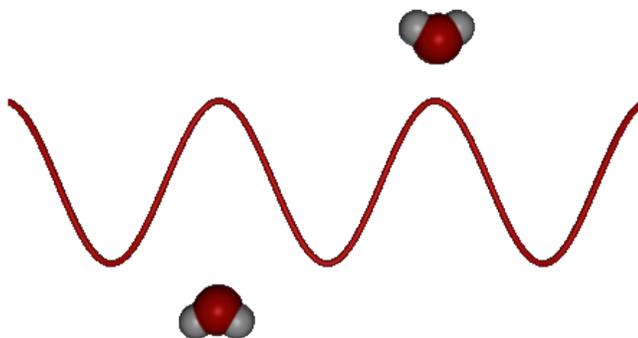


Figura 14. Rotación Dipolar

Los gases no pueden ser calentados mediante irradiación microondas ya que las distancias entre las moléculas en rotación son demasiado grandes, además, no poseen momentos dipolares adecuados para las pérdidas dieléctricas. A su vez, los sólidos cristalinos son prácticamente transparentes a la radiación microondas, ya que si las moléculas se encuentran formando una estructura cristalina no pueden moverse libremente como en el caso de los líquidos.

1.3.3.2 Conducción Iónica:

El otro mecanismo principal de calefacción es la conducción iónica. Durante la aplicación del campo electromagnético oscilante las partículas cargadas disueltas (iones) en una muestra oscilan de un lado a otro provocando colisiones con los átomos o moléculas vecinas. Estas colisiones causan agitación o movimiento produciendo calor. Así, si dos muestras que contienen la misma cantidad de agua desionizada y agua mineral, respectivamente, son calentadas con radiación microondas a una potencia de irradiación fija el mismo tiempo, el agua mineral se calentara más rápido debido al contenido en iones [35].

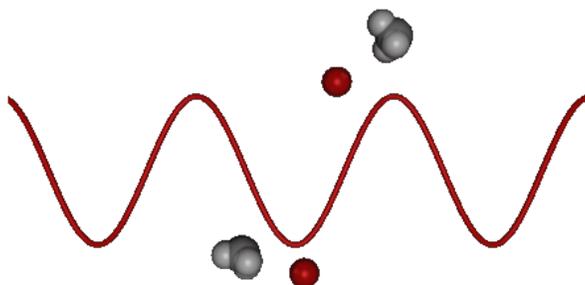


Figura 15. Conducción Iónica

Los efectos de la conducción iónica son particularmente importantes cuando se está trabajando con líquidos iónicos y en microondas. El mecanismo de la conductividad es mucho más fuerte que el de la rotación dipolar en cuanto a la generación de calor.

La radiación microondas no influye en la orientación de las colisiones, ni en la energía de activación. Sin embargo, la energía microondas afecta a los parámetros de temperatura descritos en la ecuación de Arrhenius (1):

$$K = Ae^{\frac{-Ea}{RT}} \quad (1)$$

Un incremento de la temperatura (debido al alto calentamiento instantáneo de las sustancias) causa un movimiento molecular más rápido, lo que repercute en un mayor número de colisiones [34].

1.3.3.3 Ventajas del calentamiento por microondas

Tradicionalmente, la síntesis orgánica se ha llevado a cabo mediante calefacción por conducción con una fuente de calor externa. Existen notables diferencias entre la calefacción dieléctrica y la calefacción térmica convencional. La calefacción por microondas no es un calentamiento por conducción o convección y, por tanto, lleva a un calentamiento volumétrico de las muestras [37].

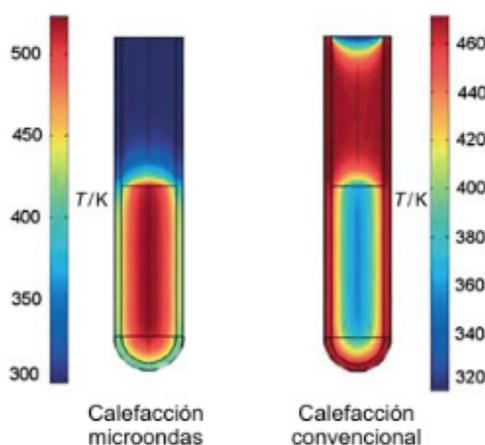


Figura 16. Calefacción microondas vs Calefacción convencional [37]

Hay diferencias notables en la forma de suministrar energía a las muestras con ambas formas de calefacción lo que confiere a la radiación microondas una serie de ventajas:

1. - Las velocidades de calefacción que proporciona la irradiación con microondas son mucho mayores que las obtenidas por calefacción convencional. Esto es debido principalmente a las propiedades dieléctricas de la materia y a la interacción onda-materia.
2. - La energía microondas es introducida en el medio de reacción a distancia, es decir, no hay contacto directo entre la fuente de energía y la muestra. La energía en el medio de reacción es generada mucho más deprisa, esto hace que tanto las velocidades de calefacción como de enfriamiento sean mucho mayores que con calefacción clásica.

3. - Tanto los reactivos químicos como los materiales de los matraces de reacción que los contienen absorben de forma diferente la radiación microondas de la calefacción convencional, de forma que se produce una calefacción selectiva.
4. - La selectividad de la calefacción microondas para una mezcla de disolventes no es drástica. Si tenemos una mezcla de disolventes uno de ellos en menor proporción, que absorbe muy bien la radiación microondas y otro, en mayor proporción, que es prácticamente transparente, la temperatura de la mezcla subirá muy rápidamente. El proceso de calentamiento por microondas implica translación y rotación, además, la velocidad de transferencia de energía es muy rápida y por tanto la calefacción será también rápida.
5. - El proceso de ebullición de los disolventes es tanto cinético como termodinámico. Por lo tanto, debido a las altas velocidades de calefacción se pueden alcanzar temperaturas en los disolventes superiores a sus temperaturas de ebullición.
6. - Todos los reactores microondas generan el mismo patrón de onda (12.5 cm en 2.45 GHz), pero dependiendo de las propiedades dieléctrica y del tamaño de la muestra puede haber variaciones en la temperatura.

1.4 TECNICAS DE CARACTERIZACION

1.4.1 Difracción de Rayos X (DRX)

La difracción de rayos X es una técnica que consiste en hacer pasar un haz de rayos X a través de un cristal. El haz se incide en varias direcciones debido a la simetría de la agrupación de átomos y por difracción da lugar a un patrón de intensidades que pueden interpretarse según la ubicación de los átomos aplicando la ley de Bragg. Esta técnica se utiliza principalmente para identificar estructuras cristalinas debido a su precisión [38]. La difracción se debe esencialmente a la existencia de cierta relación de fase entre dos o más ondas. Las diferencias de camino óptico conducen a diferencias de fase que a su vez producen un cambio en la amplitud. Cuando dos ondas están completamente desfasadas se anulan entre sí, ya sea porque sus vectores sean cero o porque estos sean igual en magnitud pero en dirección contraria. Por el contrario, cuando dos ondas están en fase, la diferencia de sus caminos ópticos es cero o un número entero de la longitud de onda. Cuando consideramos la difracción de rayos X de longitud de onda λ y paralelos en estructuras ordenadas, existen diferencias de camino óptico debido a la distancia entre los átomos en posiciones equivalentes de la red cristalina en la dirección del haz de rayos X (d). Para que se observe difracción de rayos X en un ángulo de observación 2θ se debe cumplir la Ley de Bragg (2).

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (2)$$

Donde n es un número entero. Si la diferencia entre caminos ópticos de todas las ondas dispersadas por diferentes puntos del cristal no es exactamente $2d\sin(\theta)$, las ondas se extinguen mutuamente y no se observa difracción [38,39].

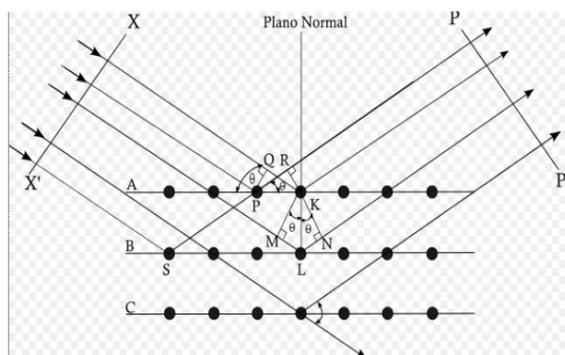


Figura 17. Deducción de la Ley de Bragg

1.4.1.1 Tamaño de cristalito

El tamaño de los granos en un material policristalino es de gran importancia en muchas de sus propiedades como por ejemplo la resistencia y dureza de un material que está relacionada con una disminución del tamaño de grano. La difracción de rayos X nos proporciona información semicuantitativa sobre el tamaño de grano dentro de un material, además de dar información sobre la perfección cristalina y la orientación. Cuando el tamaño de los cristales individuales es menor de 10^{-5}cm generalmente se utiliza el término "tamaño de partícula". Los cristales que se encuentran en este rango de medida causan una ampliación de los anillos de Debye, que son las trazas de los conos de difracción que aparecen para cada reflexión al hacer incidir un haz de rayos X sobre una muestra, el grado de ampliación de estos anillos está dado por la siguiente ecuación:

$$\beta = \frac{0.9 \lambda}{\tau \cos\theta} \quad (3)$$

Donde β es la ampliación de la línea de difracción medida a la mitad de la intensidad máxima y está dada en radianes y τ es el tamaño de partícula. Todas las líneas de difracción tienen una amplitud medible, incluso cuando el tamaño del cristal excede los 1000 \AA debido a tales causas como divergencia del haz incidente y el tamaño de la muestra [39].



Figura 18. Difractómetro Rigaku Ultima IV

1.4.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Esta espectroscopia se fundamenta en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se de una transición vibracional de la molécula. Es decir, la molécula comienza a vibrar de una determinada manera gracias a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja. Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces [40]

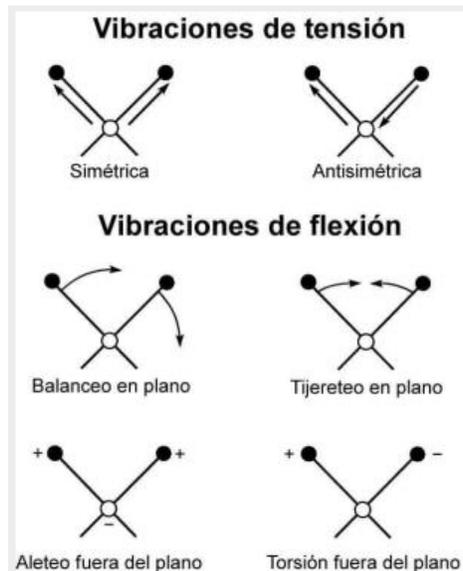


Figura 19. Diferentes tipos de vibraciones moleculares [40]

En principio, cada molécula presenta un espectro IR característico (huella dactilar), debido a que todas las moléculas (excepto las especies diatómicas homonucleares como O_2 y Br_2) tienen algunas vibraciones que, al activarse, provocan la absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo [40].

De esta forma, analizando cuales son las longitudes de onda que absorbe una sustancia en la zona del infrarrojo, podemos obtener información acerca de las moléculas que componen dicha sustancia.



Figura 20. Espectrofotómetro Bruker, Vector 33.

1.4.3 Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación. El análisis se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independientes de la frecuencia de la luz incidente. Es una técnica de análisis que se realiza directamente sobre el material sin la necesidad de ningún tipo de preparación especial y que no conlleva ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis [40].

En la dispersión Raman la energía de la luz incidente no es suficiente para excitar la molécula a un nivel electrónico de mayor energía. Por lo tanto el resultado de la dispersión Raman es cambiar el estado vibracional de la molécula.

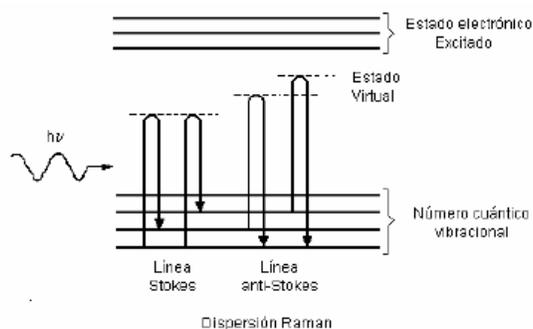


Figura 21. Diagrama energético de una molécula mostrando la dispersión Raman [40].

Líneas Stokes y anti-Stokes

Para que una molécula exhiba el efecto Raman, la luz incidente debe inducir un cambio en el momento dipolar o un cambio en la polarizabilidad molecular. La dispersión Raman contiene líneas Stokes y anti-Stokes; sus frecuencias corresponden a la suma y diferencia de las frecuencias de la luz incidente y las frecuencias vibracionales moleculares permitidas. Cuando los fotones interactúan con una molécula, una parte de su energía se puede convertir en varios modos de vibración de la molécula. Como normalmente la población de los estados excitados es mucho menor que la del estado básico, la dispersión Raman Stokes es mucho mas intensa que la dispersión anti-Stokes.

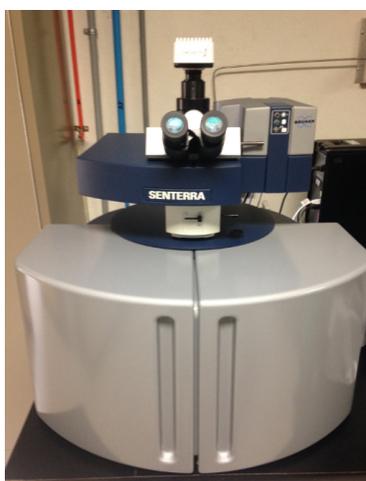


Figura 22. Espectrofotómetro Bruker, SENTERRA.

1.4.4 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

El microscopio electrónico de barrido es un microscopio que utiliza electrones como fuente luminosa, el haz de electrones es generado en el cañón electrónico, el haz electrónico es enfocado por lentes electromagnéticas. Esta constituido principalmente por un cañón electrónico, una lente condensadora y una lente objetiva. La lente objetiva cuenta con dos pares de bobinas electromagnéticas que permiten mover el haz de electrones de un lado a otro y de arriba a abajo, este movimiento permite barrer toda la superficie de la muestra.

Interacción del haz con la muestra

Durante la interacción del haz de electrones con la muestra se producen diferentes tipos de señales que incluyen electrones secundarios, electrones retrodispersos y rayos X característicos. El haz electrónico al incidir sobre el material genera diferentes tipos de radiación. Cada radiación puede ser captada por un detector específico.

Los electrones secundarios son producidos por choques entre los electrones incidentes y la banda de conducción de los átomos de la muestra. Tienen energía muy baja de entre 3 y 5 eV y proporcionan información topográfica. Los electrones retrodispersos son electrones del haz incidente que son dispersados fuera de la muestra. Estos electrones son de alta energía y el grado de dispersión es directamente proporcional al numero atómico de los átomos del material que pueden ser utilizados para distinguir elementos ligeros de pesados [41].



Figura 23. Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6060LV y diagrama de funcionamiento.

1.4.5 Espectroscopia de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS)

La espectroscopia por dispersión de energía (por sus siglas en inglés EDS) es una técnica analítica para el análisis elemental o caracterización química de una muestra. Es una de las variantes de la espectroscopia de fluorescencia de rayos X que se basa en la investigación de una muestra a través de las interacciones entre la radiación electromagnética y la materia, el análisis de rayos X emitidos por la materia en respuesta a ser golpeado con partículas cargadas. Sus capacidades de caracterización se debe en gran parte con el principio fundamental de que cada elemento tiene una estructura única que permite atómica rayos X que son característicos de la estructura atómica de un elemento que se identifican de forma única el uno del otro.

Para estimular la emisión de rayos X característicos en una muestra, un haz de alta energía de partículas cargadas como los electrones o protones, o un haz de rayos X, se centra en la muestra en estudio. En reposo, un átomo dentro de la muestra contiene estado fundamental (o no excitado) electrones en niveles discretos de energía o capas de electrones ligados al núcleo. El haz incidente puede excitar un electrón en un depósito interior, de expulsarlo de la cáscara, mientras que la creación de un agujero de electrones, donde el electrón era. Un electrón de una capa exterior, de mayor energía, entonces se llena el agujero, y la diferencia de energía entre el depósito de mayor energía y la cáscara de menor energía puede ser liberada en forma de rayos-X. El número y la energía de los rayos X emitidos por un ejemplar puede ser medido por un espectrómetro de dispersión de energía. Como la energía de los rayos X son característicos de la diferencia de energía entre las dos bandas, y de la estructura atómica de los elementos de los que fueron emitidos, lo que permite la composición elemental de la muestra a medir [42].

1.4.6 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)

El microscopio electrónico utiliza un fino haz de electrones acelerados que, al impactar con la muestra, genera una serie de señales directamente relacionadas con la estructura atómica del objeto investigado. Estas señales se seleccionan por separado para generar distintos tipos de imágenes y obtener datos analíticos. En el MET los electrones transmitidos con y sin dispersión se utilizan para crear imágenes de transmisión convencionales, de campo oscuro y alta resolución, revelando la estructura interna de las muestras, tamaño y distribución de partículas, su red cristalina, interfaces y defectos puntuales de la red atómica. Los rayos X generados son utilizados para estudiar la composición química de la muestra, pudiendo analizar aisladamente zonas de muy pocas micras e incluso nanométricas. Finalmente, mediante la difracción de electrones (electrones dispersados elásticamente) puede hacerse un detallado estudio cristalográfico del material investigado.

Por otra parte con este microscopio se puede obtener un diagrama de difracción de la muestra, lo que nos aporta una valiosa información sobre la estructura cristalina de la misma. Esto es posible si hacemos incidir el haz de electrones sobre un cristal con un ángulo capaz de satisfacer la ley de Bragg para una determinada distancia entre planos atómicos d_{hkl} . Ya que la longitud de onda de los electrones es muy pequeña ese ángulo también lo es por lo que el haz debe incidir prácticamente paralelo a los planos reticulares. El diagrama de difracción está formado por los puntos de corte de los haces difractados y transmitido con el plano de la pantalla. Representa, por tanto, la sección de la red recíproca del cristal en el plano normal al haz de electrones [43].

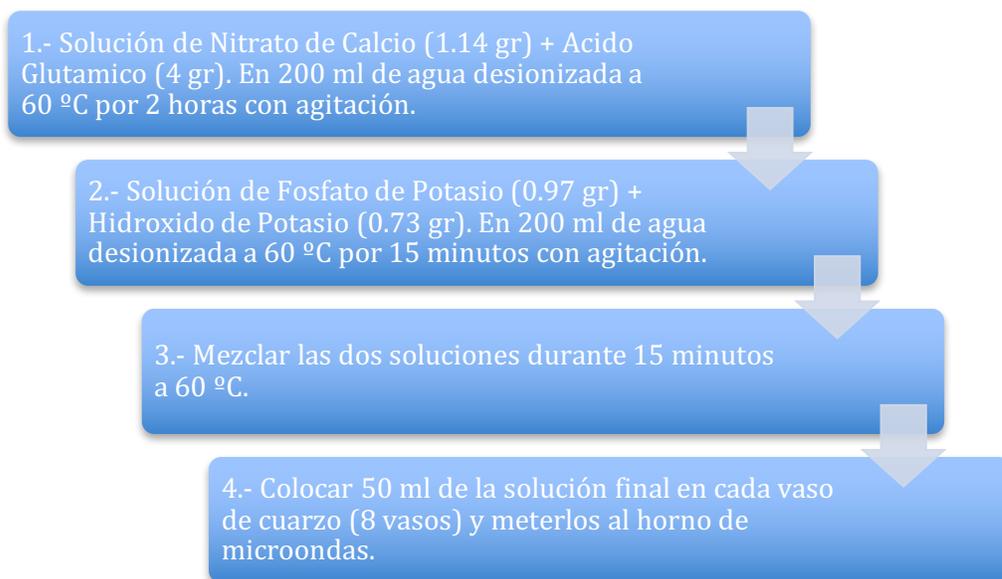


Figura 24. Microscopio Electrónico de Transmisión

CAPITULO 2 : METODOLOGIA EXPERIMENTAL

En este capítulo se mostrará la metodología que se llevó a cabo para la obtención de las nanofibras de hidroxiapatita, así como los parámetros que se tomaron en cuenta para la optimización del proceso de síntesis. Para iniciar con los experimentos se tomó como base la metodología reportada en trabajos anteriores, una vez que se hizo ésta revisión se procedió a realizar una serie de experimentos variando algunos de los parámetros del proceso, para al final obtener las condiciones óptimas de la obtención de nanofibras de hidroxiapatita.

A continuación se muestra la metodología propuesta en trabajos anteriores.



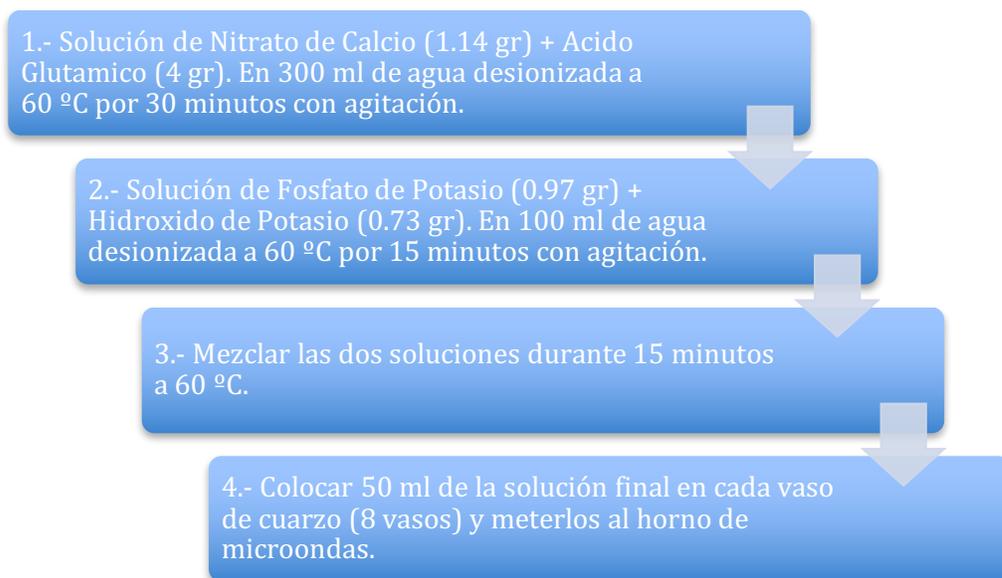
En la siguiente tabla se muestran las condiciones de operación del horno de microondas.

Potencia	1200 W	Rampa de calentamiento	10 min.
Temperatura	170 °C	Reacción	45 min.
Presión Max.	80 bar	Rampa de enfriamiento	10 min.

Tabla 6. Parámetros horno de microondas (metodología anterior)

Una vez que se realizaron varios experimentos con la metodología mostrada anteriormente, se observó que efectivamente obteníamos nanofibras de hidroxiapatita, por lo que el siguiente paso fue la optimización del proceso de síntesis.

A continuación se muestra la metodología optimizada



El principal parámetro que se optimizó en el proceso de síntesis fue el tiempo, observamos que el ácido glutámico era el compuesto que más tardaba en disolverse por lo que se decidió colocar más agua desionizada en la solución del ácido glutámico, además de ir añadiendo poco a poco el ácido en la solución. Con esta modificación se pudo reducir el tiempo a solo 30 minutos, lo que nos dio un margen más amplio para poder realizar más experimentos por día.

Potencia	1200 W	Rampa de calentamiento °C/min	10 min.
Temperatura	170 °C	Reacción	45 min.
Presión Max.	80 bar	Rampa de enfriamiento °C/min	15 min.

Tabla 7. Parámetros horno de microondas (metodología optimizada)

En cuanto a los parámetros de funcionamiento del horno de microondas solo se realizó una modificación en la rampa de enfriamiento, se incrementó de 10 a 15 minutos, ya que observamos que al enfriar demasiado rápido las nanofibras se rompían.

Proceso de síntesis (paso a paso)



Solución 1: Acido Glutámico + Nitrato de Calcio



Solución 2: Fosfato de Potasio + Hidróxido de Potasio



Solución 3: Mezcla de las soluciones 1 y 2



50 ml en cada vaso de cuarzo



Colocar cada vaso en el carrusel del horno



Establecer parámetros de operación del horno



Con el proceso de síntesis optimizado se procedió a realizar experimentos donde se interrumpiera el tiempo de reacción para poder observar la cinética de crecimiento de las nanofibras y hacer un estudio comparativo. Los experimentos realizados y las condiciones experimentales se muestran en la tabla 8.

Muestra	Temperatura (°C)	Potencia (Watts)	Tiempo de Reaccion (minutos)
HAp-1	170	1200	15
HAp-2	170	1200	30
HAp-3	170	1200	45

Tabla 8. Condiciones experimentales de las reacciones de síntesis.

CAPITULO 3 : RESULTADOS y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 DIFRACCION DE RAYOS X (DRX)

La primer técnica de caracterización que se utilizó fue difracción de rayos X por polvos para identificar las fases cristalinas que se encontraban en todas las muestras así como para determinar la dirección preferencial de crecimiento producida por la variación de los parámetros de reacción. Para analizar las muestras, éstas fueron densamente empaquetadas en un portamuestras de aluminio sin ningún proceso de molienda. Todos los experimentos fueron llevados a cabo en un difractómetro Rigaku Ultima IV usando la radiación $\text{Cu } k_{\alpha}$, con una longitud de onda $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$, un voltaje de aceleración de 40 kV y una corriente de 30 mA. Los difractogramas fueron tomados de 5° a 80° con una velocidad de 10° por minuto.

En las siguientes figuras se muestran los patrones de difracción de las tres muestras de hidroxiapatita HAp-1, HAp-2 y HAp-3, donde se puede observar el efecto del tiempo de reacción sobre la estructura cristalina.

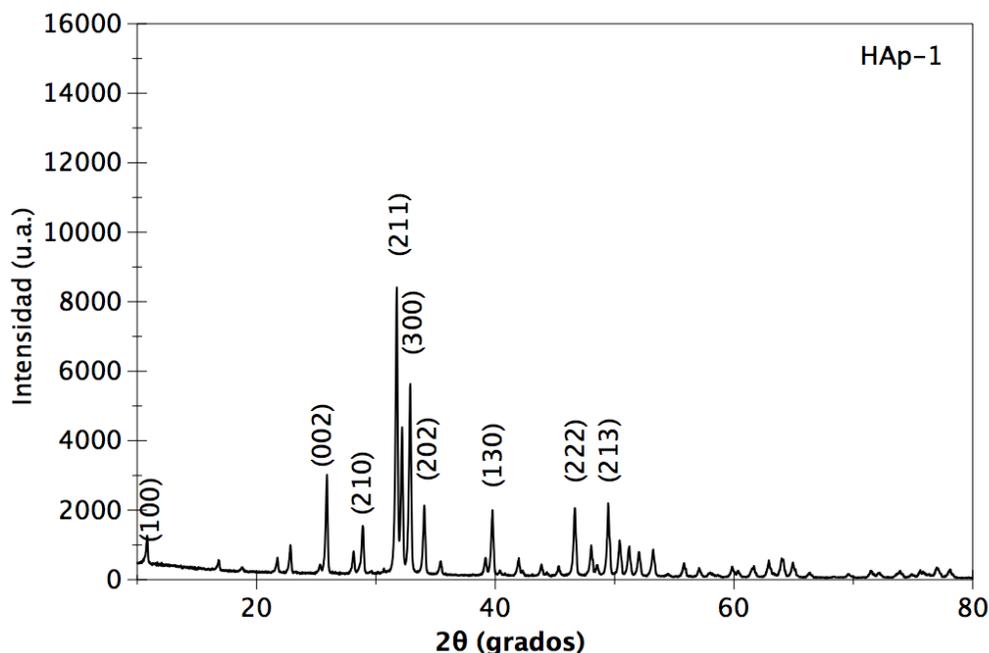


Figura 25.- Patrón de difracción HAp-1

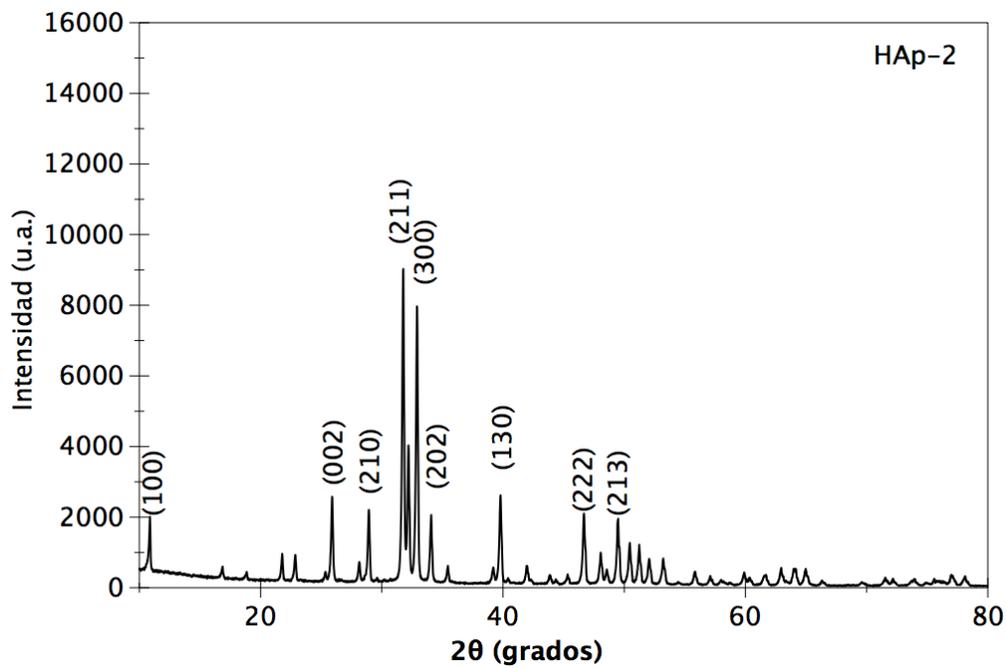


Figura 26.- Patrón de difracción HAp-2

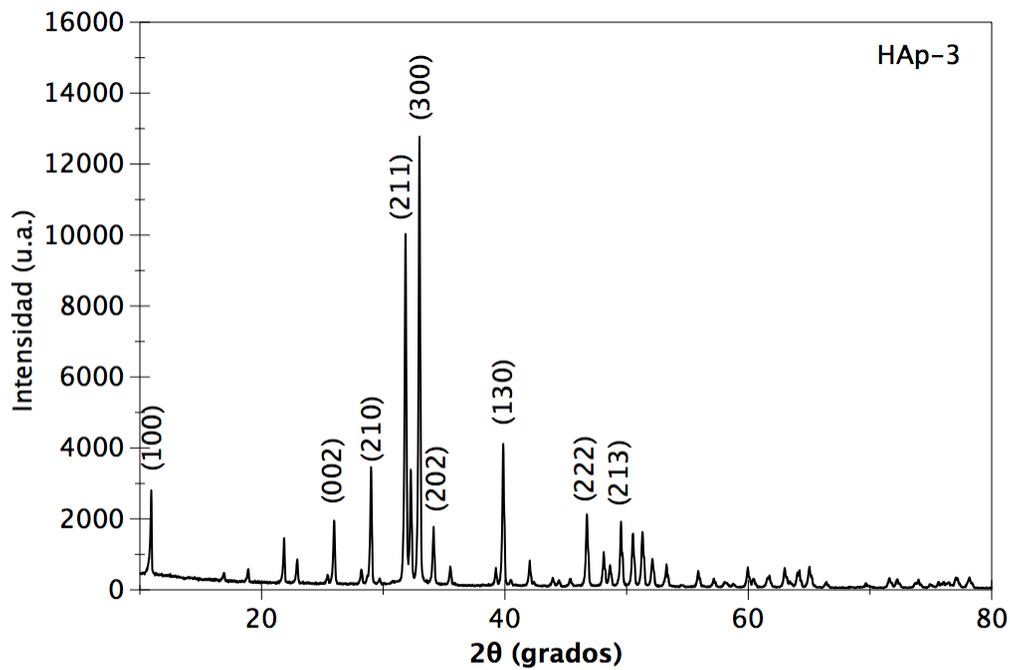


Figura 27.- Patrón de difracción HAp-3

En todas las muestras se hizo la identificación de la fase cristalina haciendo uso del International Centre for Diffraction Data (ICDD) y en todas las muestras se identificó una sola fase cristalina lo cual es un indicativo de la pureza de la hidroxiapatita obtenida. La fase cristalina presente en todas las muestras se identificó como hidroxiapatita sintética en fase hexagonal de acuerdo al PDF #84-1998. Las reflexiones de Bragg más relevantes que se observaron en los difractogramas corresponden a los planos (100), (002), (210), (211), (300), (202), (130), (222), (213) y sus intensidades relativas varían de muestra a muestra.

En el PDF que se mencionó antes, las reflexiones más intensas corresponden a los planos (211) y la siguiente reflexión más intensa es la (300) que corresponde a un 60.9% de la intensidad registrada en el plano (211). La relación de intensidades entre estos dos planos (211)/(300) de acuerdo al PDF es de 1.642. En el caso de las muestras que se obtuvieron en este trabajo la relación de intensidades fue de 1.509 para HAp-1, 1.141 para HAp-2 y 0.792 para HAp-3, por lo que la intensidad de la reflexión del plano (300) incrementó conforme aumentó el tiempo de reacción, lo cual es un indicativo de la orientación preferencial del crecimiento cristalino. Del mismo modo se realizó la relación de intensidades entre los planos (211)/(100) y se obtuvieron resultados de 6.727 para HAp-1, 4.588 para HAp-2 y 3.6 para HAp-3 mientras que en el PDF mencionado el valor de esta relación es de 5.649, de igual manera se observa un incremento en la reflexión del plano (100) como consecuencia del tiempo de reacción. Por último se realizaron los cálculos para la relación de los planos (211)/(002), los valores obtenidos fueron 2.846 para HAp-1, 3.534 para HAp-2 y 4.941 para HAp-3, el valor reportado en el PDF para esta relación es de 2.785. Estos últimos cálculos son un indicativo de que el cristal tiene un crecimiento preferencial en la dirección [100].

Además de esto, en todos los difractogramas se puede observar que el FWHM de todas las reflexiones es muy angosto y de acuerdo a la ecuación de Scherrer [44,45] la cristalinidad aumenta conforme decrece el FWHM.

En la muestra HAp-1 se observa que la reflexión mas intensa es la asociada al plano (211) de acuerdo al PDF# 84-1998, por lo que esta muestra presenta una orientación cristalográfica preferencial a lo largo del eje “a”. Conforme se incrementó el tiempo de reacción en las muestras HAp-2 y HAp-3 se observó un aumento en la intensidad de la reflexión relacionada con el plano (300) lo que nos indica un crecimiento preferencial del cristal en la dirección [001] de la estructura de la hidroxiapatita.

El tiempo de reacción es la variable responsable del cambio en la dirección de crecimiento de la nanofibras de hidroxiapatita cuando se usa un precursor rico en ácido glutámico. De acuerdo a trabajos previos se ha reportado que el crecimiento cristalino ocurre en la dirección [211] cuando se usan mezclas de reacción sin ácido glutámico [46]. Los mejores resultados en términos de cristalinidad y morfología de las nanofibras se obtuvieron para un tiempo de reacción de 45 minutos. En este caso todas las muestras presentan una buena cristalinidad, lo cual es un parámetro importante en los requerimientos médicos para recubrimientos de acuerdo a las normas ASTM e ISO [47].

En trabajos previos [46, 47] se han reportado nanoestructuras de hidroxiapatita bajo condiciones experimentales similares sin una dirección preferencial de crecimiento y sin usar ácido glutámico como guía en el crecimiento del cristal. En este trabajo las nanofibras crecieron a lo largo de la dirección [001] por lo que el tiempo de reacción y la presencia del ácido glutámico juegan un papel importante en la dirección de crecimiento de las nanofibras de hidroxiapatita.

En la tabla 9 se muestran los tamaños de cristalito para todas las muestras.

Sample	Crystallite size (nm)
HAp-1	4.36
HAp-2	5.24
HAp-3	6.06

Tabla 9. Tamaños de cristalito

3.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER

La Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier, por sus siglas en ingles FTIR, se utilizó como una técnica complementaria a la Difracción de Rayos X para obtener mas información sobre las estructura molecular de la hidroxiapatita y sobre los grupos funcionales presentes en las muestras. En las siguientes figuras se muestran los espectros IR de las tres muestras obtenidas, en los cuales se pueden observar las bandas características de la estructura de la hidroxiapatita. Las bandas de absorción localizadas en 3571 cm^{-1} (ν_3), y 632 cm^{-1} (ν_1), son atribuidas a los grupos hidroxilo (OH^-) de la estructura y las bandas localizadas a 1103 and 1040 cm^{-1} (ν_3), 960 cm^{-1} (ν_1), 602 and 564 cm^{-1} (ν_4), and 474 cm^{-1} (ν_2) corresponden al grupo fosfato (PO_4^{3-}) [48]. Estas bandas son típicas de la estructura molecular de la hidroxiapatita y están presentes en todas las muestras con diferentes intensidades y ancho en los picos.

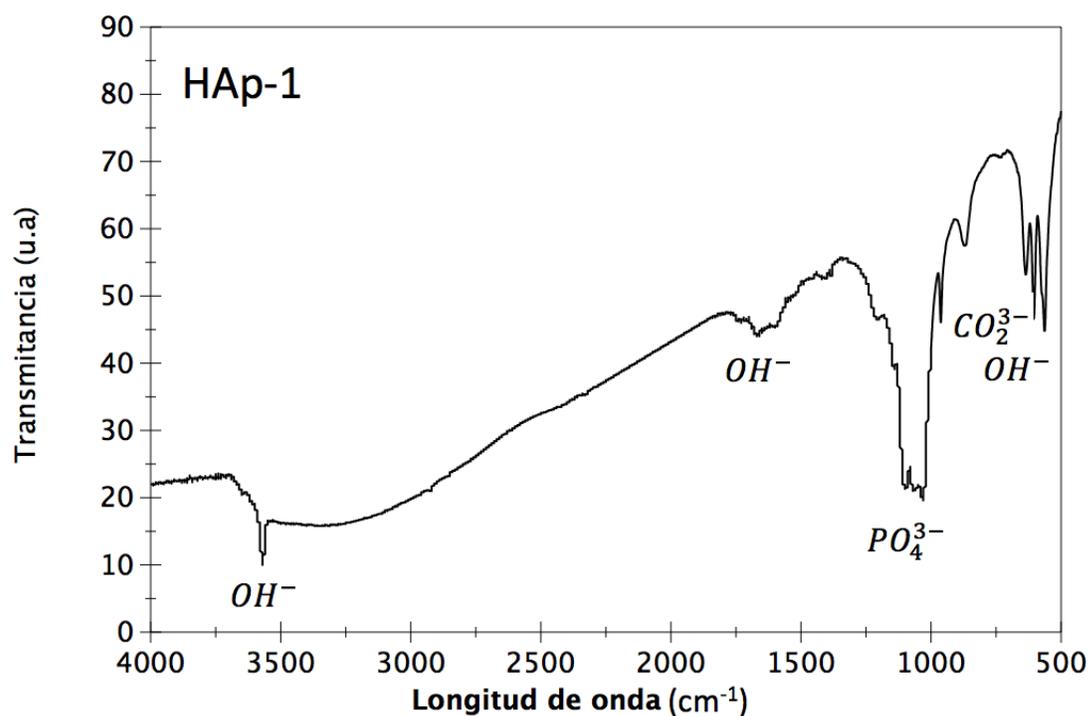


Figura 28.- Espectro IR HAp-1

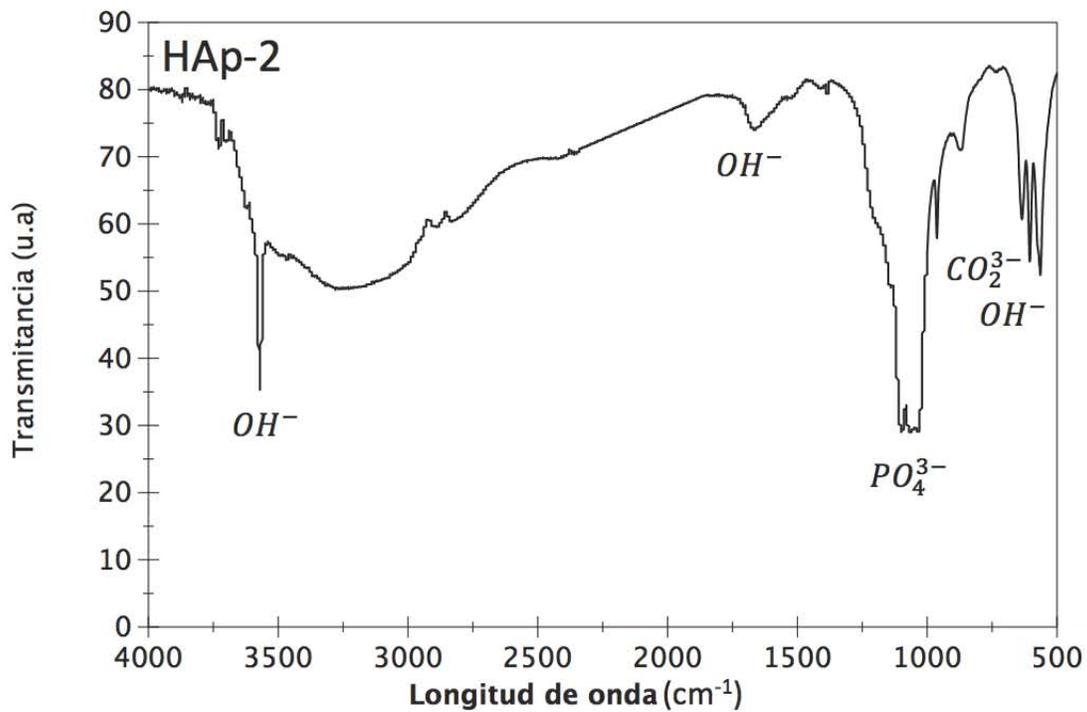


Figura 29.- Espectro IR HAp-2

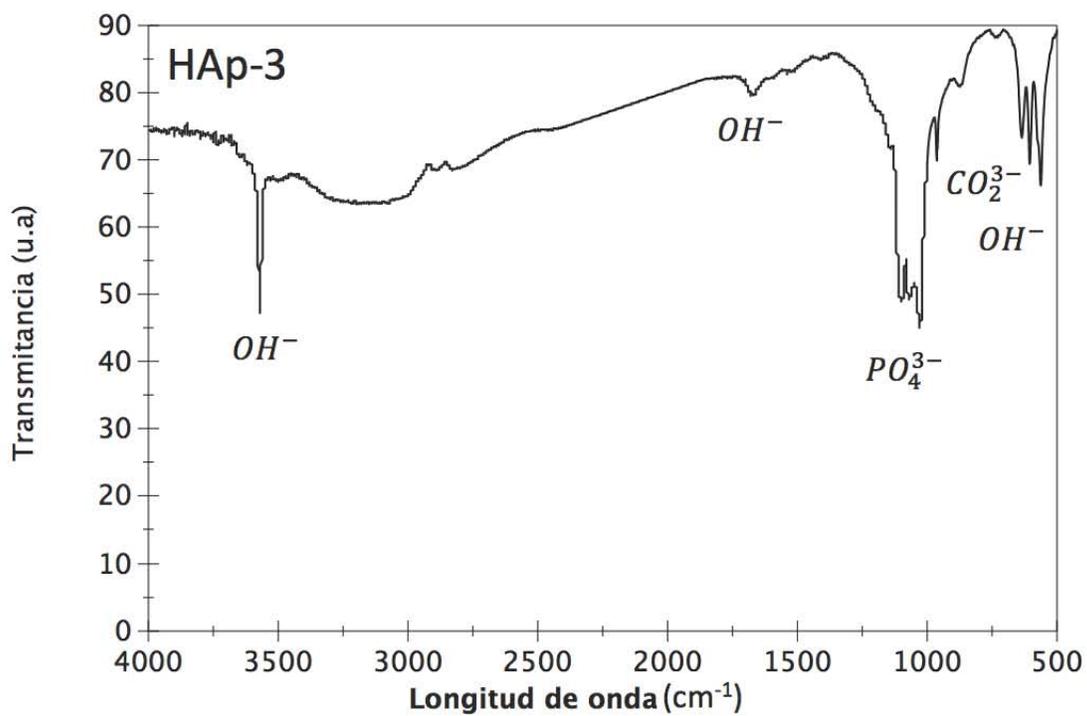


Figura 30.- Espectro IR HAp-3

Además en todos los espectros FTIR se pueden observar bandas localizadas a 1470 cm^{-1} (ν_3), and 860 cm^{-1} (ν_2) asociadas al grupo carbonato (CO_3^{2-}) [49]. En las muestras HAP-2 y HAp-3 se puede observar la incorporación de agua dentro de la estructura como un pico ancho entre $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ (modo estiramiento) y $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ (modo flexión) [50]. En todas la muestras las bandas de absorción están bien definidas, lo que indica que tienen un alto grado de cristalinidad y que esta de acuerdo con los resultados obtenidos por DRX. La banda a 3571 cm^{-1} corresponde a la vibración de los grupos -OH localizados a lo largo del eje “c” en la estructura cristalina de la hidroxiapatita y debido a que parece intensa y bien definida podría ser un indicativo de que las fibras están creciendo a lo largo del eje “c”, lo cual esta de acuerdo con los resultados de DRX.

3.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN

En las siguientes figuras se muestran los espectros Raman de todas las muestras. Estos espectros muestran un pico característico a 961 cm^{-1} $PO_4(\nu_1)$ [51,52]. Además se observan varios picos con baja intensidad, dos picos a 1046 y 1076 cm^{-1} correspondientes a la vibración $PO_4(\nu_3)$ [53,54,55], tres picos a 610 , 594 y 582 cm^{-1} correspondientes a la vibración $PO_4(\nu_4)$ [52,53] y finalmente dos picos que se observan a 447 y 433 cm^{-1} de la vibración $PO_4(\nu_2)$ [52,53,54], todos estos picos son asignados a los modos vibracionales de los grupos fosfato.

En la figura HAp-1 se puede ver que todos los picos tienen una intensidad mas baja comparada con las figuras HAp-2 y HAp-3. Se podría decir que con el incremento en el tiempo de reacción y un consecuente incremento en la cristalinidad de la hidroxiapatita, los grupos fosfato tienen un mejor arreglo espacial lo cual produce señales Raman con intensidades mas altas.

Banda (cm^{-1})	Modo Vibracional
1076, 1046	Estiramiento asimétrico triplemente degenerado (ν_3) del grupo PO_4
961	Modo de estiramiento totalmente simétrico (ν_1) del grupo tetrahedral PO_4
610, 594, 582	Modo de flexión triplemente degenerado (ν_4) del grupo PO_4
447, 433	Modo de flexión doblemente degenerado (ν_2) del grupo PO_4

Tabla 10. Desplazamientos Raman observados para las muestras HAp-1, HAp-2 y HAp-3

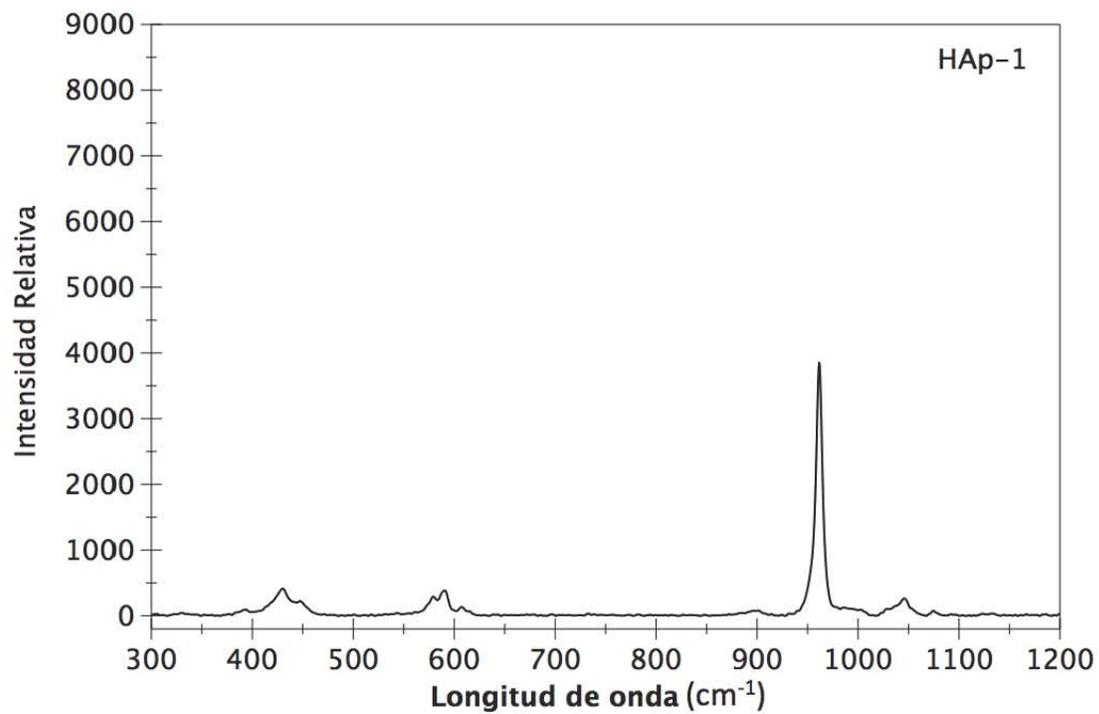


Figura 31.- Espectro Raman HAp-1

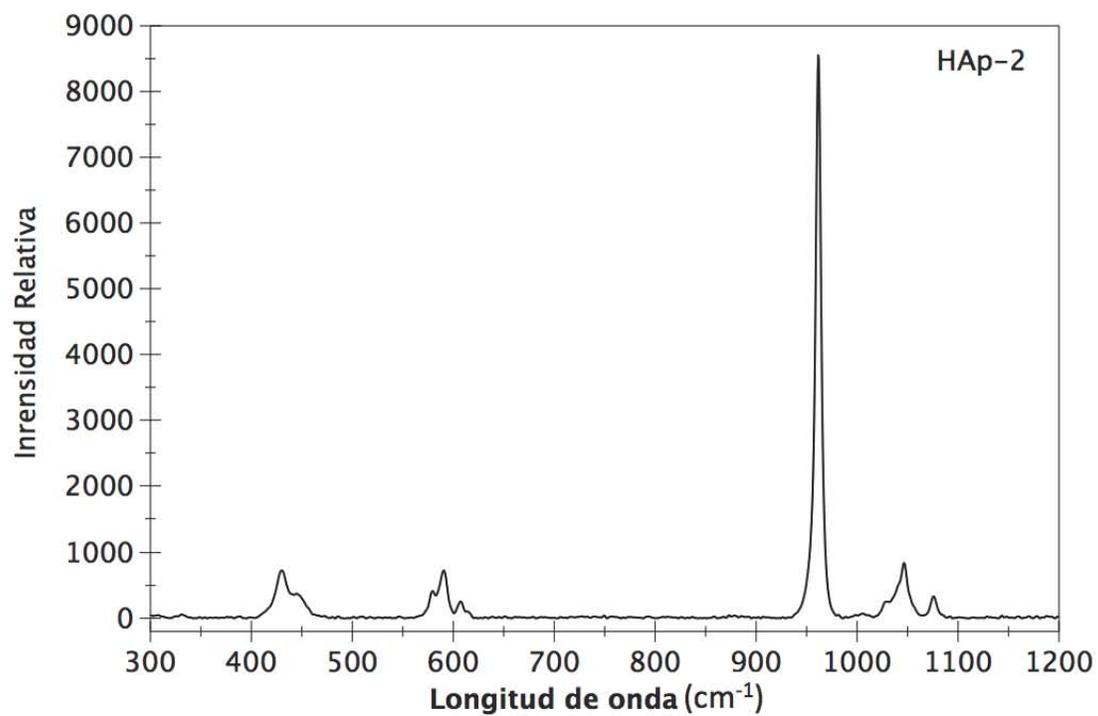


Figura 32.- Espectro Raman HAp-2

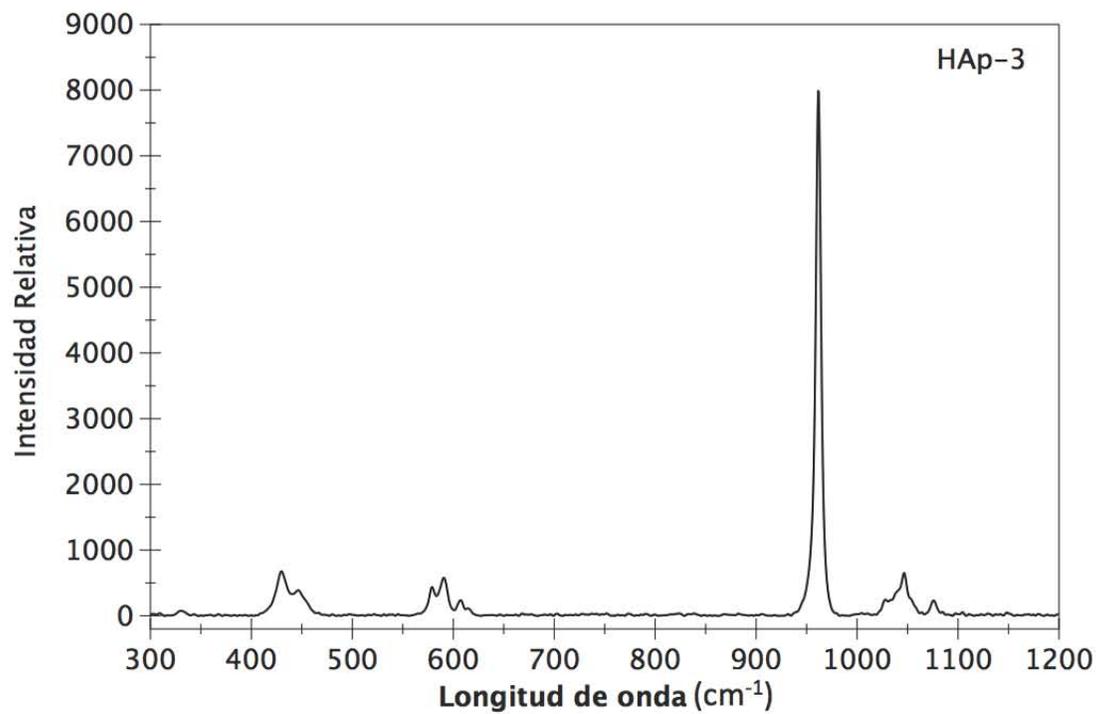


Figura 33.- Espectro Raman HAp-3

3.3 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (MEB)

La microscopía electrónica de barrido se utilizó para caracterizar la morfología y microestructura de la superficie de cada muestra. En las siguiente figura se muestran las imágenes de MEB obtenidas de las nanofibras de hidroxiapatita, en todos los casos se observan nanofibras hexagonales que a su vez se encuentran empaquetadas en una microfibrila con morfología hexagonal con un diámetro de 450 nm y largo de 70 μm en promedio.

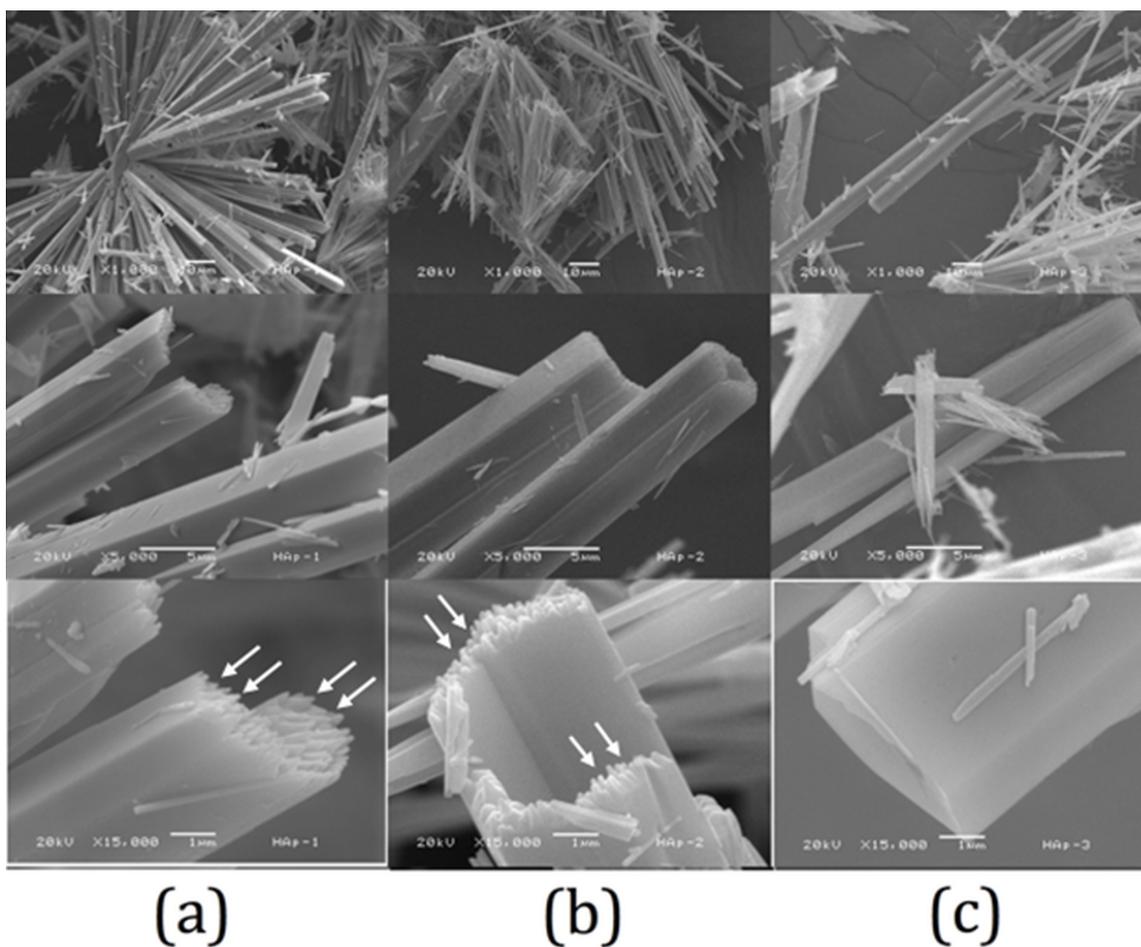


Figura 34.- Micrografías a 1000X, 5000X y 15000X de a) HAp-1 b) HAp-2 c) HAp-3

En la tabla 10 se muestra como cambió la longitud y el diámetro de las nanofibras con respecto al tiempo de reacción.

Tiempo de reacción	Longitud	Diámetro
15 min.	66 μm	94 nm
30 min.	73 μm	102 nm
45 min.	80 μm	100 nm

Tabla 11. Longitud y diámetro de las nanofibras

La superficie de todas las nanofibras parece ser bastante suave y sus caras y bordes están bien definidos, esta característica es un indicativo de una alta cristalinidad. En muchas micrografías se encontraron microfibras con una forma hexagonal y muchas de ellas aparecían rotas, esto se debe principalmente al rápido proceso de enfriamiento cuando termina el tiempo de reacción.

Usando las caras de las fibras rotas se obtuvieron imágenes con una amplificación de 5000 y 15000X, donde se registró que algunas de ellas (HAp-1 y HAp-2) son huecas y su pared externa parece estar hecha de varias nanofibras empaquetadas como se indica con las flechas. Además se puede observar la punta de aguja de estos paquetes de nanofibras.

Una observación mas detallada usando microscopia electrónica de barrido de emisión de campo, por sus siglas en ingles FESEM, permitió observar la morfología de las nanofibras. La siguiente figura muestra una imagen de electrones secundarios de algunas nanofibras de la muestra HAp-2.

La superficie parece ser bastante suave y las facetas y bordes están mejor definidos. La sección transversal de estas fibras es hexagonal y poseen un diámetro promedio de 84 nm y una longitud en el orden de cientos de micras. Cabe destacar que las nanofibras tienen una morfología similar a la observada para las microfibras.

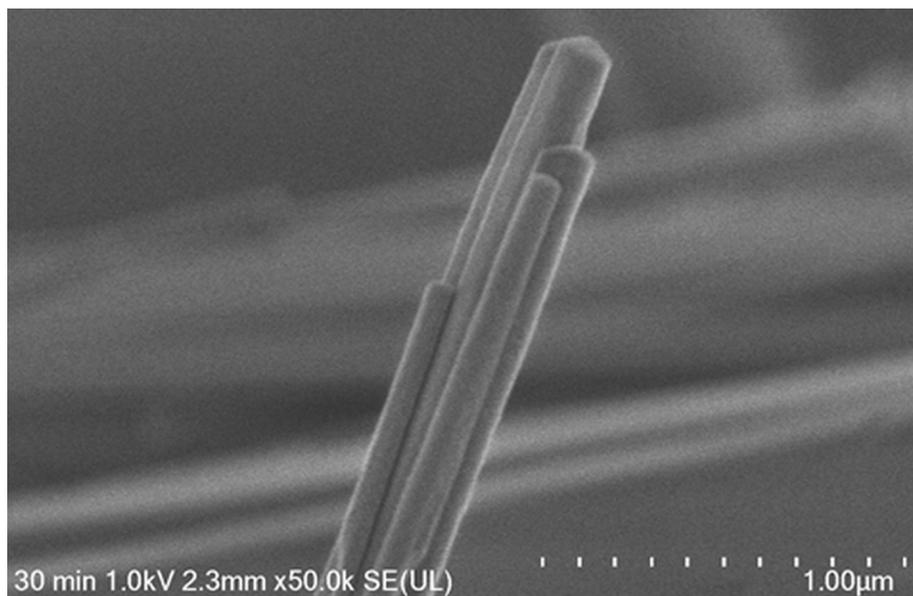


Figura 35.- Imagen de electrones secundarios FESEM de una nanofibra de HAp

3.4 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION (MET)

La microscopía electrónica de transmisión fue utilizada para estudiar la microestructura de las nanofibras. En la siguiente figura se muestra una típica imagen MET de una nanofibra (HAp-3). El diámetro en esta nanofibra fue homogéneo y uniforme, esta medida fue muy corta comparada con la longitud y el espesor promedio fue de 100 nm. El tiempo de reacción no tiene influencia sobre el diámetro de las nanofibras. Las determinaciones hechas para el diámetro de las muestras HAp-1, HAp-2 y HAp-3 exhibieron ligeros cambios sin ninguna tendencia. Los valores de diámetro promedio obtenidos fueron de 94, 102 y 100 nm para HAp-1, HAp-2 y HAp-3 respectivamente.

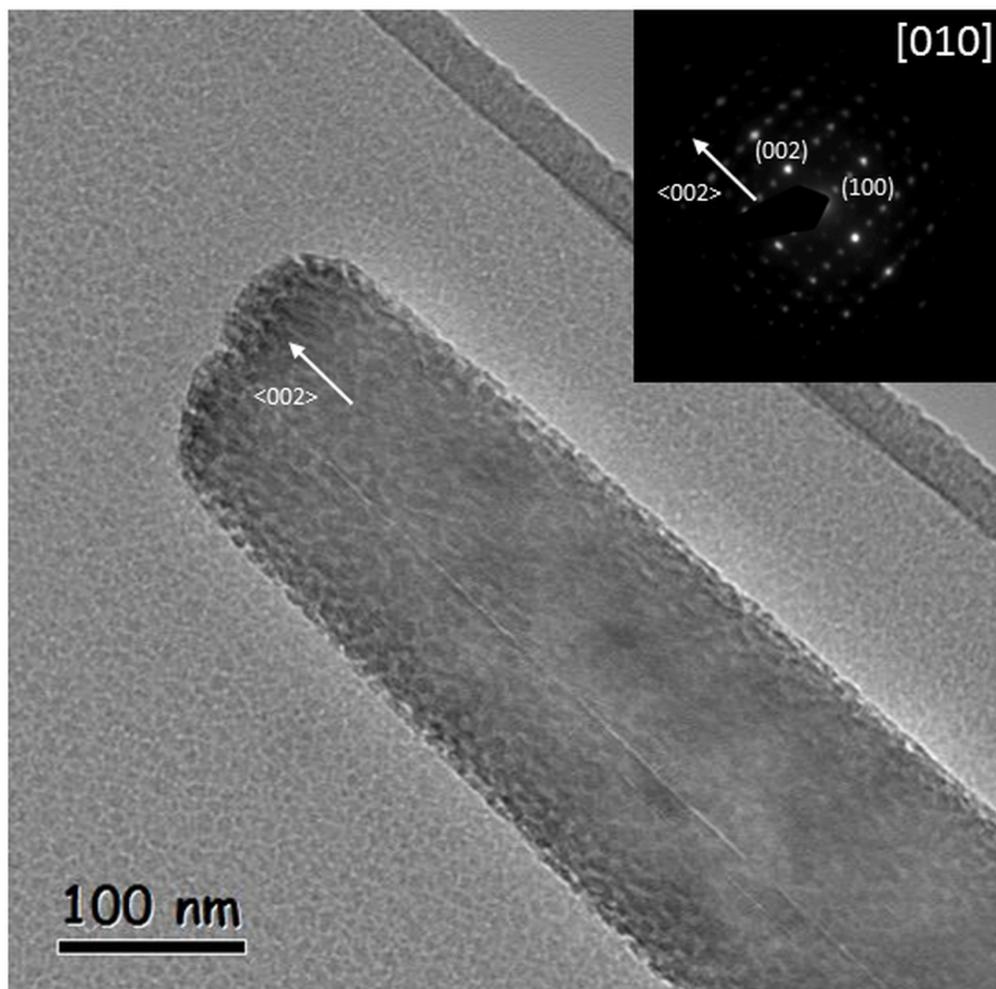


Figura 36.- Imagen HRTEM de una nanofibra de HAp. Se indica el patrón de difracción de electrones en el eje de zona $[010]$ y la dirección de crecimiento $\langle 002 \rangle$

El patrón de difracción de electrones (PDE) se muestra en la esquina superior de la figura 36. El patrón de puntos es formado por la contribución de los planos (100) y (002) de la estructura hexagonal de la hidroxiapatita. De acuerdo al PDE, los planos (002) mostraron una mas alta intensidad, sugiriendo que la estructura de la nanofibra esta formada básicamente por estos planos. Adicionalmente, la simetría 2 y la distribución de puntos en el patrón indican un eje de zona en la dirección $[010]$, esto indica que la nanofibra fue observada en el plano “ac” o “bc”.

La siguiente figura muestra una imagen de la punta de una nanofibra tomada por Microscopía Electrónica de Alta Resolución o por sus siglas en ingles HRTEM. La nanofibra tuvo un arreglo de líneas con una separación de 0.344 nm correspondiente a la distancia interplanar de los planos (002) en la estructura cristalina de HAp. Además la imagen por Transformada Rápida de Fourier o por sus siglas en ingles FFT, muestra que los puntos mas intensos corresponden a los planos (002), lo cual esta de acuerdo con el argumento de que las nanofibras están creciendo en la dirección del “eje c”. Además estos resultados están de acuerdo con los estudios hechos por DRX Y MEB, verificando que las nanofibras obtenidas crecieron preferencialmente en la dirección cristalina <002>. La morfología y crecimiento en una dirección particular son factores importantes para las posibles aplicaciones de este material.

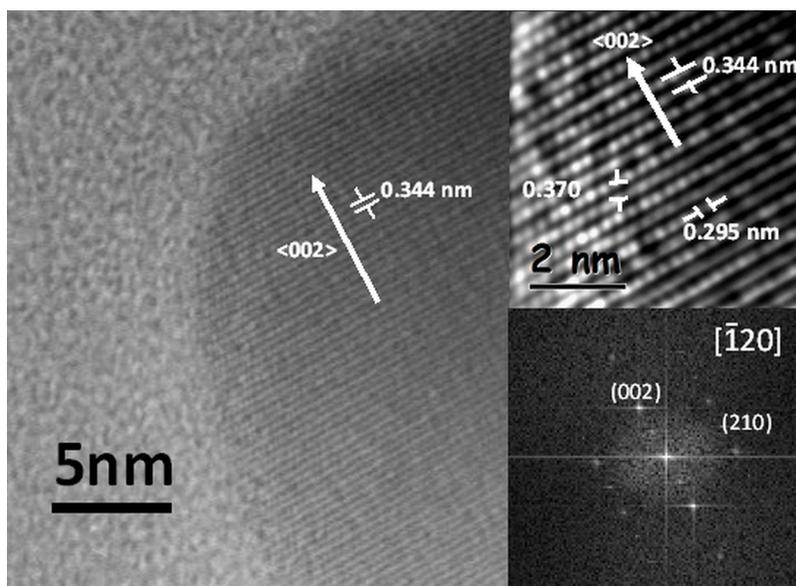


Figura 37.- Imagen HRTEM de la punta una nanofibra de HAp.

En las imágenes de MEB y FESEM se observó que las nanofibras exhiben un crecimiento tipo aguja. La siguiente figura muestra una nanofibra de aproximadamente 100 nm de diámetro. Este diámetro es consistentemente reducido en el final de la nanofibra produciendo una forma piramidal como se puede observar en la imagen. Los ángulos fueron medidos para generar un modelo del crecimiento del cristal, realizado con el software JCrystal Soft KrystalShaper V 1.3.1, como se muestra en la parte central de la figura.

Adicionalmente se incluyó la estructura cristalina de la hidroxiapatita con los correspondientes planos, mostrando que esta estructura esta creciendo en el eje “c” en la dirección $\langle 001 \rangle$.

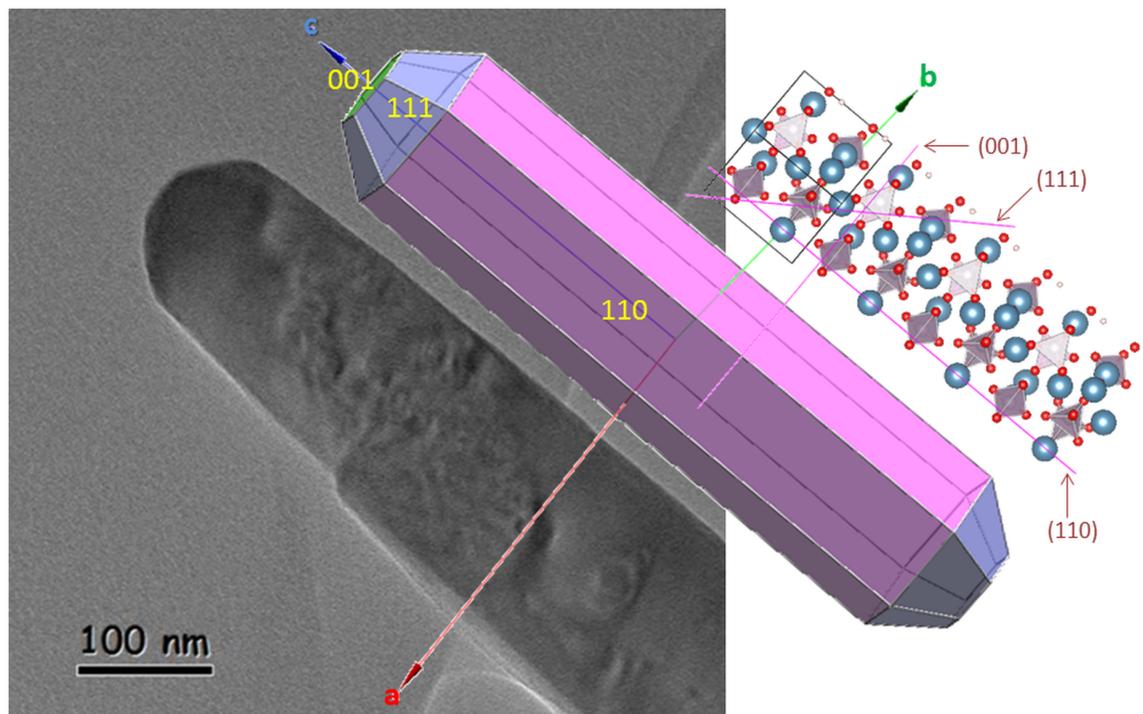


Figura 38.- Imagen MET de la punta de una nanofibra.

Las siguientes imágenes MET muestran la punta de las nanofibras, se puede ver claramente que en la muestra HAp-1 y HAp-3 las nanofibras son policristalinas, pero en la muestra HAp-2 no se nota claramente esta propiedad, por lo que las nanofibras exhiben regiones policristalinas pero hay áreas grandes donde crecen como un monocristal como se observa en la muestra HAp-2.

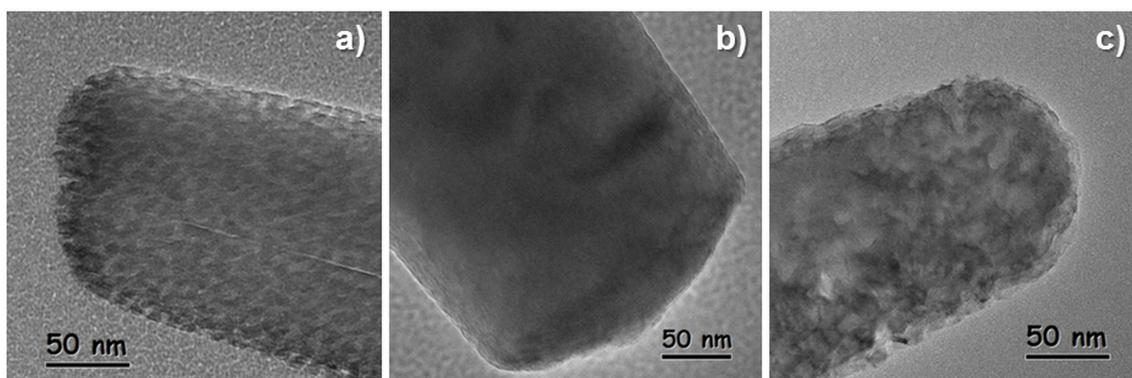


Figura 39.- Imagen MET de la punta de las nanofibras (a) HAp-1, (b) HAp-2 y (c) HAp-3

3.5 ESPECTROSCOPIA POR DISPERSIÓN DE ENERGÍA

La espectroscopia por dispersión de energía o por sus siglas en inglés EDS se utilizó para determinar la composición elemental de las nanofibras. La relación Ca/P es muy importante en las nanofibras de hidroxiapatita para diferentes aplicaciones potenciales como la biocompatibilidad, la hidroxiapatita estequiométrica tiene una relación Ca/P de 1.67 y en la hidroxiapatita biológica se encuentra entre 1.59 y 1.71.

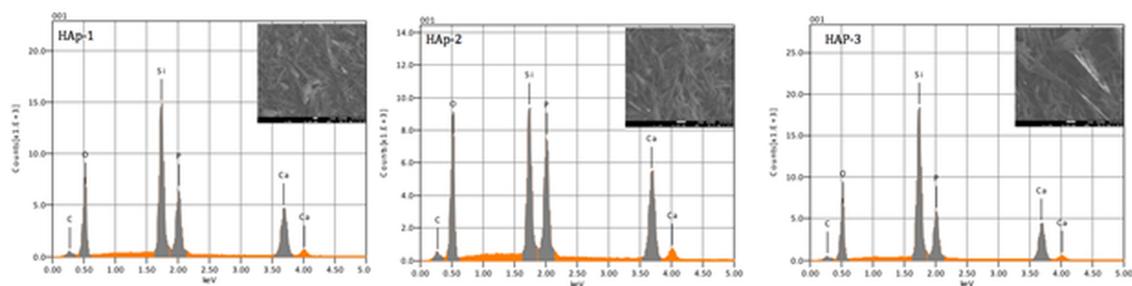


Figura 40. Espectros EDS

En la figura se muestran los espectros EDS para cada muestra. Los análisis fueron hechos en diferentes áreas de cada una de las muestras obteniendo siempre el mismo valor. Además los resultados de porcentaje atómico fueron usados para calcular el promedio de la composición elemental de cada muestra. La siguiente tabla muestra el promedio de la relación Ca/P para cada muestra.

Muestra	Ca/P ratio
HAp-1	1.66
HAp-2	1.65
HAp-3	1.69

Tabla 12. Promedios de la relación Ca/P para cada muestra.

CONCLUSIONES

Los parámetros de síntesis usados en este trabajo permitieron obtener reproducibilidad en la síntesis de nanofibras de hidroxiapatita. Las nanofibras de hidroxiapatita fueron obtenidas con una alta cristalinidad y una morfología bien definida. Las imágenes obtenidas por MEB mostraron una morfología hexagonal tipo aguja de las nanofibras. Los estudios hechos por DRX, TEM Y HRTEM indican que las nanofibras crecieron en una dirección cristalina preferencial a lo largo del eje “c” de la estructura hexagonal de hidroxiapatita, lo cual podría mejorar las propiedades mecánicas del material.

La longitud de las nanofibras incrementó con el tiempo de reacción, se obtuvieron fibras con una longitud promedio de 70 μm y un diámetro del orden de 100 nm. De acuerdo a los patrones de DRX se observó una dirección cristalina preferencial en la dirección [001], lo cual se atribuye a la concentración de ácido glutámico usado en la mezcla de reacción así como al tiempo de reacción. La composición elemental y la relación Ca/P sugiere que las nanofibras pueden ser usadas para la manufactura de materiales biocerámicos o compositos para aplicaciones biomédicas.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Y. Bar-Cohen, in *Biomimetics Nature-Based Innovation*, ed. Y. Bar-Cohen, Taylor and Francis (CRC Press), Boca Raton, FL, 2011. p. 14.
- [2] L. T. Kuhn, D. J. Fink and A. H. Heuer, in *Biomimetic Materials Chemistry*, ed. S. Mann, Wiley-VCH, United Kingdom, 1996, p. 41.
- [3] R. L. Reis, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 2003, 7, 263.
- [4] M. Vallet-Regí and D. Arcos, *Biomimetic Nanoceramics in Clinical Use: From Materials to Applications*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2008.
- [5] W. E. Brown, N. Eidelman and B. Tomazic, *Adv. Dent Res.*, 1987, 1, 306.
- [6] W. E. Brown and M. U. Nysten, *J. Dent. Res.*, 1964, 43, 751.
- [7] A. J. Friedenstein, *Int. Rev. Cytol.*, 1976, 47, 327.
- [8] B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen and J. Lemons. *Biomaterials Science. An introduction to Materials in Medicine*. Academic Press, San Diego, USA (1986).
- [9] J.B. Park, *Biomaterials Science and Engineering*, (Plenum Press, New York, 1984).
- [10] A. Ravaglioli and A. Krajewski, *Bioceramics; Materials Properties and Applications* (Chapman & Hall, London, 1992).
- [11] K. Mattox, "The Global Biomaterials Market Where Hard Tissue Biomaterials Fit In" en *BIOMATERIALS - Hard Tissue Repair and Replacement*. Vol. 3 (D. Muster, editor), Elsevier, Amsterdam, 1992.
- [12] L.L. Hench, "Bioceramics; from concept to clinic", *J. Am. Ceram. Soc.*, 74: 1487-1510 (1991).
- [13] G.S. Duffó, *Biomateriales, una mejor calidad de vida*, EUDEBA, serie Ciencia Jóven, Buenos Aires, (2006).
- [14] Gartner LP y Hiatt JL. *Histología. Texto y atlas*. 3ª edición. McGraw-Hill Interamericana. México. 2008.
- [15] Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG. *Functional Histology*. New York: Churchill Livingstone ed.; 1987. p. 142-60.

- [16] Eric M. Rivera Muñoz, Rodrigo Velázquez, Lauro Bucio Galindo, Irma A. Belío, Jorge Campa Molina y Guadalupe Sandra Ulloa Godínez, *Biomateriales: fundamentos, técnicas y aplicaciones*, 2007.
- [17] Young MF. Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif Tissue Int* 2003;72:2-4.
- [18] José Luis Gómez Ortega, Nora Elizondo Villarreal, Héctor Martín Guerrero Villa. *Visualización cristalográfica de la hidroxiapatita*. 2004, Vol. VII, No. 24.
- [19] WILLIAMS, R. A. D. y Elliot J. C. *Bioquímica dental básica y aplicada. El Manual Moderno*. México. ISBN 0-443-03144-4. p. 316
- [20] PARKS, J. and LAKES, R. *Biomaterials : an introduction*. New York, Plenum PRESS. 1992. 2a ed.
- [21] *"The Merck index, 11th"*, Ed., Merck & Co. Inc., 1989.
- [22] Jarcho M., Jasty V., Gumaer K., Kay J. and Doremus R.; *"Electron Microscopy Study of a Bone-Hydroxyapatite Implant Interface"*, *Transactions Society for Biomaterials*, 112-113, (1978).
- [23] LeGeros R., Parsons J., Daculsi G. and Walker M.; *"Significance of the Porosity and Physical Chemistry of Calcium Phosphate Ceramic: Biodegradation-Bioabsorption"*, *Annual New York Academy Science* 523, 268-271, (1988).
- [24] Bucholz R., Carlton A. and Holmes R.; *"Interporous Hydroxyapatite as a Bone Graft Substitute in Tibial Plateau Fractures"*, *Clin. Orthop.*, 240, 53-62, (1989).
- [25] Drobeck H., Rothstein S., Gumaer K., Sherer A. and Slighter R.; *"Histologic Observation of Soft Tissue Responses to Implanted Multifaced Particles and Disc of Hydroxyapatite"*, *J. Oral Maxi. Surg.* 42, 143-149, (1984).
- [26] Sella C., Martin J., Lecoeur J., Le Chanu A., Hamand M., Naji A. and Davidas J.; *"Biocompatibility and Corrosion Resistance in Biological Media of Hard Ceramics Coatings Sputter Deposited on Metal Implants"*, *Materials Science and Engineering*. 39, 49-57, (1991).
- [27] Méndez-González M. and Cauich J. V.; *"Preparation of porous hydroxyapatite tablets and porous hydroxyapatite coatings for orthopedic use"* *Bioceramics*. 13, 192-195, (2001).
- [28] Rivera-Muñoz Eric *et al.*, *Morphological Analysis of Hydroxyapatite Particles Obtained by Different Methods*. *Materials Science Forum* Vols. 638-642 (2010) pp 681-686.

- [29] RODRÍGUEZ-LORENZO, L. M. and Vallet-Regí, M. Controlled crystallization of calcium phosphate apatites. *Chem. Mater.* 2000, 12, 2460-2465.
- [30] LIU, J.; YE X.; WANG H.; ZHU M.; WANG B. and YAN H. The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method. *Ceramics International.* 29, 2003: 629-633.
- [31] VALLET-REGÍ, María. Biocerámicas: inertes y bioactivas. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat.* V. 90, No. 4, 269-279. España. 1996.
- [32] BERNACHE-ASSOLLANT D.; Ababou, A.; Champion, E. and Heughebaert, M. Sintering of calcium phosphate hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ I. Calcination and particle growth. *Journal of the European Ceramic Society* 23 (2003) 229-241.
- [33] FULMER Mark T.; Ison, Ira C.; Hankermayer, Christine R.; Constantz, Brent R. and Ross, John. Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites. *Biomaterials.* Elsevier. 23 (2002) 751-755.
- [34] David Aradilla Zapata, Ramón Oliver Pujol y Francesc Estrany Coda,; *La química de la radiación de microondas*, Técnica Industrial 284, 2009
- [35] D. R. Baghurst, D. M. P. Mingos, *Chem. Soc. Rev.*, **1991**, 20, 1.
- [36] C. Gabriel, S. Gabriel, E. H. Grant, B. S. Halstead, D. M. P. Mingos, *Chem. Soc. Rev.*, **1998**, 27, 213.
- [37] C. O. Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 6250
- [38] B.D. Cullity. *Elements of X-Ray Diffraction*, Addison Wesley Publishing Company.
- [39] Ralph W. G. Wyckoff *The Structure of Crystals*, 2nd Ed., Chemical Catalog Company, New York 1931.
- [40] Nakamoto K., "Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds", Ed. John Wiley & Sons, New York, 1997.
- [41] M. Hayat, (1981) Fixation for electron microscopy, Academic Press.
- [42] A.J.Garratt-Reed y D.C.Bell, Energy-Dispersive X-Ray Analysis in the Electron Microscope (BIOS Scientific Publishers Limited, 2003).
- [43] Heimendahl, Manfred von; Electron microscopy of materials : an introduction, Academic Press, NewYork (1980).
- [44] Velazquez-Hernandez, I. Rojas-Rodriguez, J. Carmona-Rodríguez, S. Jiménez-Sandoval, M.E. Rodríguez-García, Structural and photocarrier radiometric characterization of $\text{Cu}_x(\text{CdTe})_y\text{O}_z$ thin films, *Thin Solid Films* 519 (2011) 2135e2140.

- [45] A. Ruksudjarit, K. Pengpat, G. Rujijanagul, T. Tunkasiri, Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite from natural bovine bone, *Curr. Appl. Phys.* 8 (2008) 270e272.
- [46] J. L. Cabrera, R. Velázquez-Castillo, E. M. Rivera-Muñoz, Synthesis of Hidroxiapatite Nanostructures Using Microwave Heating, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Vol. 11, 1-7, 2011.
- [47] Y. Yang, K.H. Kim, J.L. Ong, A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering processean alternative to plasma spraying, *Biomaterials* 26 (2005) 327e337.
- [48] A. Ruksudjarit, K. Pengpat, G. Rujijanagul, T. Tunkasiri, Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite from natural bovine bone, *Curr. Appl. Phys.* 8 (2008) 270e272.
- [49] Velazquez-Hernandez, I. Rojas-Rodriguez, J. Carmona-Rodríguez, S. Jiménez-Sandoval, M.E. Rodriguez-Garcia, Structural and photocarrier radiometric characterization of $Cux(CdTe)_yOz$ thin films, *Thin Solid Films* 519 (2011) 2135e2140.
- [50] E. Kusrini, M. Sontag, Characterization of X-ray diffraction and electron spin resonance: effects of sintering time and temperature of bovine hydroxyapatite, *Radiat. Phys. Chem.* 81 (2012) 118e125.
- [51] Y. Yang, K.H. Kim, J.L. Ong, A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering processean alternative to plasma spraying, *Biomaterials* 26 (2005) 327e337.
- [52] A. Costescu, I. Pasuk, F. Ungureanu, A. Dinischiotu, M. Costache, F. Huneau, S. Galaup, P. Le Coustumer, D. Predoi, Physico-chemical properties of nano- sized hexagonal hydroxyapatite powder synthesized by solegel, *Dig. J. Nanomater. Bios.* 5 (2010) 989e1000.
- [53] E. Kusrini, M. Sontag, Characterization of X-ray diffraction and electron spin resonance: effects of sintering time and temperature of bovine hydroxyapatite, *Radiat. Phys. Chem.* 81 (2012) 118e125.
- [54] de Aza PN, Guitian F, Santos C, de Aza S, Cusco R, Artus L. Vibrational investigation of calcium phosphate compounds. 2. Comparison between hydroxyapatite and -tricalcium phos- phate. *Chem Mater* 1997;9:916–922.
- [55] Sauer GR, Zunic WB, Durig JR, Wuthier RE. Fourier transform Raman spectroscopy of synthetic and biological calcium phos- phates. *Calcif Tissue Int* 1994;54:414–420.