



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOSISTEMAS HÍBRIDOS:**

**BIO-HIDROXIAPATITA / HIDROXIAPATITA SINTÉTICA”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

**PRESENTA:**

ING. LUIS FERNANDO ZUBIETA OTERO

**TUTOR PRINCIPAL:**

DR. MARIO ENRIQUE RODRÍGUEZ GARCÍA

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

DRA. BEATRIZ MARCELA MILLÁN MALO

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

DR. JOSÉ DE JESÚS PÉREZ BUENO

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO EN  
ELECTROQUÍMICA

**QUERÉTARO, QRO.**

**MARZO 2020**



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

La hidroxiapatita es un biocerámico fundamental en la naturaleza debido a que es un componente del tejido óseo de los animales vertebrados, el cual sirve como soporte, protege partes y órganos delicados. El sistema esquelético en los seres humanos es esencial para nuestras actividades cotidianas por lo que cuidarlo es primordial, pero a su vez no estamos exentos de tener lesiones que afecten su integridad, por lo que encontrar una solución a afecciones óseas es importante para la salud pública. Una lesión puede resultar costosa debido a los elevados precios de los insumos, la escasez de donantes y el frecuente rechazo del sistema inmune del paciente, por lo que hoy en día es difícil tratar estas enfermedades.

Con el objetivo de auxiliar con el desarrollo de una posible solución en este tipo de lesiones, se desarrolló un estudio para obtener nanosistemas híbridos de bio-hidroxiapatita (BIO-HAp) / hidroxiapatita sintética (HAp Syn). Primero, se comenzó a partir de hueso cortical de fémur de origen porcino; el cual se le realizó una limpieza alcalina que consiste en usar hidróxido de potasio e hidróxido de sodio (KOH y NaOH; 1M) para desengrasar y desproteinizar la matriz mineral. Enseguida, se usó sonoquímica para reducir el tamaño del aglomerado de BIO-HAp a escala nanométrica. Posteriormente, se efectuó la síntesis de la hidroxiapatita sintética por medio de precipitación química usando fosfato monobásico de amonio ((NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y nitrato de calcio (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O) como precursores químicos e incorporando las nanopartículas de BIO-HAp como semillas de nucleación y controlando un pH de 9 con hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH).

Finalmente, la caracterización de las muestras se llevó por medio de espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) y Análisis Termogravimétrico (TGA) para ver la eliminación de grasas y proteínas. El tamaño de partícula se efectuó por Dispersión Dinámica de Luz (DLS). El análisis morfológico se estudió mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM). El análisis de Difracción de Rayos X (DRX) sirvió para identificar las fases minerales y la orientación cristalina. Y, por último, se usó Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) para estudiar el arreglo cristalino y determinar las posibles orientaciones cristalinas preferenciales. Todo esto con el fin de poder realizar un recubrimiento en frío para piezas metálicas para aplicaciones médicas.

# DEDICATORIAS

*A Dios, por todas las bendiciones recibidas, gracias.*

*A los amores de mi alma y de mi vida: Lupita y Fersh.*

*A mi madre por el amor y apoyo incondicional.*

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre, ya que todo lo que tengo y he realizado es gracias a ti.

A mi Lupita y mi Fernando, que me cambiaron la vida desde el momento en que los conocí y me convirtieron en la mejor versión de mí.

A mi familia y mis amigos por el apoyo en todo momento.

Al Dr. Mario Enrique Rodriguez Garcia por ser más que un asesor, un amigo que te enseña, te aconseja, te regaña y sobre todo te educa a ser una mejor persona.

A mi comité tutor: Dra. Beatriz M. Millán Malo y Dr. José de J. Pérez Bueno, por el apoyo para realizar esta investigación de posgrado y al Jurado por las observaciones a esta tesis.

A mis compañeros del Laboratorio A-4 (Radiometría): Dra. Sandra, Dr. Cristian, Dr. Ezéquiél, Dra. Brenda y a todos los chicos, ya que hicieron amena, colaborativa y divertida mi estancia en el laboratorio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) por aceptarme, instruirme y prepararme en el Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales (PCEIM). Es un orgullo pertenecer a la mejor universidad de México y de Latinoamérica. “Por mi raza hablará el espíritu”.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero para realizar mis estudios de posgrado (CVU No. 846256) y por el proyecto de Investigación Científica Básica: A1-S-8979. De igual modo al PAEP (Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado) y DGAPA-UNAM-PAPIIT (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica) con folios: IN112317 y IN114320 por el apoyo económico para realizar mis estancias académicas, compra de materiales y reactivos, y por la beca de conclusión de estudios para mi maestría.

A los académicos y técnicos por el apoyo para caracterizar las muestras que presento en este documento: Dra. Beatriz M. Millán Malo, M. en C. Carlos E. Ornelas Gutiérrez, Dr. Rodrigo A. Esparza Muñoz, Ing. Valeria Gómez, Dr. Ángel R. Hernández Martínez, Ing. Wilber Antunez y la M. en C. Alicia del Real López.

# CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>DEDICATORIAS</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>CONTENIDO</b> .....	5
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	7
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	10
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	17
4.1. Objetivo general.....	17
4.2. Objetivos específicos .....	17
<b>V. MARCO TEÓRICO</b> .....	18
5.1. Tejido óseo.....	18
5.1.1. <i>Matriz orgánica</i> .....	21
5.1.2. <i>Matriz celular</i> .....	23
5.1.3. <i>Matriz mineral</i> .....	24
5.2. Hidroxiapatita .....	25
5.2.1. <i>Tipos de hidroxiapatita</i> .....	26
5.2.1.1. Natural .....	26
5.2.1.2. Sintética .....	28
5.3. Síntesis por precipitación química (HAp) .....	29
5.4. Hidrólisis alcalina hidrotérmica.....	30
5.5. Sonoquímica .....	31
5.6. Técnicas de caracterización .....	32
5.6.1. <i>Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)</i> .....	32
5.6.2. <i>Análisis termogravimétrico (TGA)</i> .....	37
5.6.3. <i>Dispersión de luz dinámica (DLS)</i> .....	43

5.6.4.	<i>Difracción de rayos X (XRD)</i> .....	49
5.6.5.	<i>Microscopia electrónica (SEM &amp; TEM)</i> .....	58
<b>VI.</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	69
6.1.	Metodología 1 (Nano Bio-hidroxiapatita) .....	69
6.1.1.	<i>Obtención de polvo de Bio-hidroxiapatita</i> .....	70
6.1.1.1.	Limpieza primaria.....	70
6.1.1.2.	Trituración, molienda y tamizado .....	71
6.1.2.	<i>Limpieza secundaria</i> .....	71
6.1.2.1.	Limpieza alcalina .....	71
6.1.3.	<i>Sonicación</i> .....	73
6.2.	Metodología 2 (Hidroxiapatita sintética).....	74
6.3.	Metodología 3 (Nanosistemas híbridos Nano BIO-HAp / HAp).....	76
6.4.	Técnicas de caracterización .....	78
6.4.1.	<i>Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	78
6.4.2.	<i>Análisis termogravimétrico (TGA)</i> .....	78
6.4.3.	<i>Dispersión de luz dinámica (DLS)</i> .....	79
6.4.4.	<i>Difracción de rayos X (DRX)</i> .....	80
6.4.5.	<i>Microscopia electrónica de barrido (SEM)</i> .....	81
6.4.6.	<i>Microscopia electrónica de transmisión (TEM)</i> .....	83
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	84
7.1.1.	<i>Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	84
7.1.2.	<i>Análisis termogravimétrico (TGA)</i> .....	86
7.1.3.	<i>Dispersión de luz dinámica (DLS)</i> .....	89
7.1.4.	<i>Microscopia electrónica de barrido (SEM)</i> .....	92
7.1.5.	<i>Difracción de rayos X (DRX)</i> .....	100
7.1.6.	<i>Microscopia electrónica de transmisión (TEM)</i> .....	104
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	110
<b>IX.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	112
<b>X.</b>	<b>PUBLICACIONES</b> .....	119

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esqueleto humano.....	18
<b>Figura 2.</b> Tipos de hueso según su forma.....	19
<b>Figura 3.</b> Estructura del hueso (compacto y esponjoso).....	20
<b>Figura 4.</b> Estructura jerárquica del hueso en varias escalas de longitud.....	20
<b>Figura 5.</b> Molécula de Colágeno.....	23
<b>Figura 6.</b> Tipos de células óseas.....	23
<b>Figura 7.</b> Representación cristalográfica de la hidroxiapatita.....	25
<b>Figura 8.</b> Fuentes de obtención de BIO-HAp y precursores químicos naturales.....	27
<b>Figura 9.</b> Preparación de HAp mediante precipitación química.....	29
<b>Figura 10.</b> Representación de un ion hidróxido (OH <sup>-</sup> ).....	30
<b>Figura 11.</b> Proceso de cavitación por ultrasonido en una burbuja.....	31
<b>Figura 12.</b> Representación en 3° dimensión de una onda electromagnética.....	32
<b>Figura 13.</b> Espectro electromagnético.....	32
<b>Figura 14.</b> Ejemplo de moléculas: HCl, O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> y Cl <sub>2</sub> .....	34
<b>Figura 15.</b> Tipo de vibraciones moleculares.....	35
<b>Figura 16.</b> Esquema de funcionamiento de un interferómetro de Infrarrojo.....	36
<b>Figura 17.</b> Descomposición térmica del carbonato de calcio.....	39
<b>Figura 18.</b> Termograma de un análisis termogravimétrico.....	40
<b>Figura 19.</b> Esquema de una termobalanza.....	41
<b>Figura 20.</b> Horno de una termobalanza.....	41
<b>Figura 21.</b> Tipos de portamuestras (crisoles) para una TGA.....	42
<b>Figura 22.</b> Esquema de un equipo TA Q500.....	43
<b>Figura 23.</b> Fluctuaciones de intensidad a través del tiempo.....	46
<b>Figura 24.</b> Diagrama esquematizado de un analizador de partícula DLS.....	47
<b>Figura 25.</b> Tipos de celda de un analizador de partícula.....	48
<b>Figura 26.</b> Primera radiografía de Röntgen.....	49
<b>Figura 27.</b> a) Radiación de frenado. b) Espectro continuo de Rayos X. c) Espectro característico de Rayos X.....	50
<b>Figura 28.</b> Esquema de una transición electrónica en un átomo.....	51
<b>Figura 29.</b> Demostración de interferencia a) constructiva y b) destructiva.....	53
<b>Figura 30.</b> Difracción de Rayos X por los planos de átomos A-A' y B-B'.....	55
<b>Figura 31.</b> Esquema transversal de un tubo de Rayos X.....	56
<b>Figura 32.</b> Esquema interno de un difractor de XRD.....	57
<b>Figura 33.</b> Microscopio de Antón van Leeuwenhoek.....	59



<b>Figura 34.</b> Esquemas de microscopios electrónicos de transmisión y barrido. ....	60
<b>Figura 35.</b> Señales producidas en la interacción electrón-muestra. ....	61
<b>Figura 36.</b> Niveles de vacío requeridos en el microscopio electrónico. ....	62
<b>Figura 37.</b> Tipos de Fuentes de electrones. ....	63
<b>Figura 38.</b> Esquema de lente electromagnético. ....	65
<b>Figura 39.</b> Esquema y modos de imagen en SEM. ....	66
<b>Figura 40.</b> Modos de imagen en TEM. ....	67
<b>Figura 41.</b> Kit para colocar una muestra en SEM (Cinta de carbón, pintura de grafito y portamuestras de aluminio). ....	68
<b>Figura 42.</b> Varilla portaobjetos y rejilla de difracción. ....	68
<b>Figura 43.</b> Etapa 1: Limpieza primaria (Obtención del polvo). ....	69
<b>Figura 44.</b> Etapa 2: Limpieza secundaria (limpieza alcalina) y Etapa 3: Sonoquímica. (obtención de nano BIO-HAp) ....	69
<b>Figura 45.</b> Limpieza primaria: <b>a)</b> Hueso antes de la limpieza. <b>b)</b> Hueso después de la limpieza. ....	70
<b>Figura 46.</b> Obtención del polvo: <b>a)</b> Trituración. <b>b)</b> Molienda. <b>c)</b> Tamizado. ....	71
<b>Figura 47.</b> Celda unitaria: <b>a)</b> KOH y <b>b)</b> NaOH. ....	72
<b>Figura 48.</b> Limpieza alcalina: <b>a)</b> Agitación. <b>b)</b> Centrifugado. <b>c)</b> Enjuague. <b>d)</b> Secado. ....	72
<b>Figura 49.</b> Homogeneizador ultrasónico portátil UP200Ht Hielscher. ....	73
<b>Figura 50.</b> Obtención de nano BIO-HAp: <b>a)</b> Disolución. <b>b)</b> Baño maría frío. <b>c)</b> Ultrasonido. <b>d)</b> Sonicación. <b>e)</b> Muestreo. <b>f)</b> Secado. ....	74
<b>Figura 51.</b> Esquema de la síntesis de hidroxiapatita sintética. ....	74
<b>Figura 52.</b> Síntesis de Hidroxiapatita: <b>a)</b> Precursores químicos. <b>b)</b> Vaso y buretas. <b>c)</b> Precipitación. <b>d)</b> Secado. ....	75
<b>Figura 53.</b> Esquema de la síntesis de nanosistemas híbridos (BIO-HAp/HAp). ....	76
<b>Figura 54.</b> Síntesis de HNS (BIO-HAp/HAp): <b>a)</b> Precursores químicos y polvos. <b>b)</b> Vaso y buretas. <b>c)</b> Precipitación. <b>d)</b> Alícuotas. <b>e)</b> Secado. ....	77
<b>Figura 55.</b> Espectrofotómetro FTIR-ATR, PerkinElmer Spectrum Two. ....	78
<b>Figura 56.</b> Balanza termogravimétrica, Mettler Toledo TGA/DSC 2 Star <sup>e</sup> System. ....	79
<b>Figura 57.</b> Analizador de tamaño de partícula, Anton Paar Litesizer 500. ....	79
<b>Figura 58.</b> Difractómetro de rayos X, Rigaku Ultima IV. ....	80
<b>Figura 59.</b> Microscopio electrónico de barrido, JEOL JSM-6060 LV. ....	81
<b>Figura 60.</b> Microscopio electrónico de barrido, JEOL JSM-7401 F. ....	81
<b>Figura 61.</b> Microscopio electrónico de barrido, Hitachi SUB230. ....	82
<b>Figura 62.</b> Microscopio electrónico de transmisión, JEOL JEM-2200 FS. ....	83
<b>Figura 63.</b> Espectros de infrarrojo de HAp Syn, P-KOH, P-NaOH y P-Raw. ....	84

<b>Figura 64.</b> Termogramas (TGA) de las muestras HAp Syn, P-KOH, P-NaOH y P-Raw...	86
<b>Figura 65.</b> Termogramas con la primera derivada: <b>a)</b> P-Raw. <b>b)</b> P-NaOH. <b>c)</b> P-KOH. ....	88
<b>Figura 66.</b> Diámetro de partícula P-KOH: <b>a)</b> PK10010. <b>b)</b> PK10020 <b>c)</b> PK10030. <b>d)</b> PK10060.....	89
<b>Figura 67.</b> Diámetro de partícula P-NaOH: <b>a)</b> PN10010. <b>b)</b> PN10020 <b>c)</b> PN10030. <b>d)</b> PN10060.....	91
<b>Figura 68.</b> Micrografías de SEM: <b>a-b)</b> P-Raw. <b>c-d)</b> P-KOH. <b>e-f)</b> P-NaOH. ....	92
<b>Figura 69.</b> Micrografías de SEM: <b>a-b)</b> PK10010. <b>c-d)</b> PK10020. <b>e-f)</b> PK10030. <b>g-h)</b> PK10060.....	94
<b>Figura 70.</b> Micrografías de SEM: <b>a-b)</b> PN10010. <b>c-d)</b> PN10020. <b>e-f)</b> PN10030. <b>g)</b> PN10060. ....	95
<b>Figura 71.</b> Micrografías de SEM: <b>a)</b> HNSPK 45. <b>b)</b> HNSPK 90. <b>c)</b> HNSPK 135. <b>d)</b> HNSPK 180 .....	96
<b>Figura 72.</b> Micrografías de SEM: <b>a)</b> HNSPN 45. <b>b)</b> HNSPN 90. <b>c)</b> HNSPN 135. <b>d)</b> HNSPN 180 .....	97
<b>Figura 73.</b> Micrografías de SEM de alta resolución: <b>a-c)</b> HAp Syn .....	98
<b>Figura 74.</b> Micrografías de SEM de alta resolución: <b>a-b)</b> HNSPK 45. <b>c-d)</b> HNSPK 180..	99
<b>Figura 75.</b> Micrografías de SEM de alta resolución: <b>a-b)</b> HNSPN 45. <b>c-d)</b> HNSPN 180..	99
<b>Figura 76.</b> Difractograma de las muestras: P-Raw, P-KOH, P-NaOH y HAp Syn.....	100
<b>Figura 77.</b> Difractograma de las muestras con proceso de sonicación: P-KOH y P-NaOH. ....	101
<b>Figura 78.</b> Difractograma de las muestras híbridas: HNSPK y HNSPN.....	102
<b>Figura 79.</b> Cálculo del FWHM del plano (002) de todas las muestras. ....	103
<b>Figura 80.</b> <b>a)</b> Simulación del tamaño de cristal (hidroxiapatita) en PDF-4. <b>b)</b> Difractograma de las muestras P-Raw, HAp Syn, PK10010 y HNSPK 45.....	104
<b>Figura 81.</b> Microscopías de TEM: <b>a-d)</b> HAp Syn.....	104
<b>Figura 82.</b> Micrografías de TEM: <b>a-d)</b> P-Raw.....	105
<b>Figura 83.</b> Micrografías de TEM: <b>a-d)</b> PK10060. <b>e-h)</b> PN10060.....	106
<b>Figura 84.</b> Micrografías de TEM: <b>a-d)</b> HNSPK45. <b>e-h)</b> HNSPK90. <b>i-l)</b> HNSPK 135. <b>m-p)</b> HNSPK 180.....	107
<b>Figura 85.</b> Micrografías de TEM: <b>a-d)</b> HNSPN45. <b>e-h)</b> HNSPN90. <b>i-l)</b> HNSPN 135. <b>m-p)</b> HNSPN 180.....	108

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Comparación de diferentes métodos para la preparación de hidroxiapatita. ....	28
<b>Tabla 2.</b> Posición en número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) de vibraciones de grupos funcionales en Infrarrojo.....	37
<b>Tabla 3.</b> Posiciones de las bandas de infrarrojo en hidroxiapatitas. ....	85
<b>Tabla 4.</b> Cuadro comparativo de las hidroxiapatitas y los nanosistemas híbridos. ....	109

# I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, las exigencias de la sociedad actual en el campo de la salud nos obligan necesariamente a diseñar, sintetizar, caracterizar y aplicar biomateriales que puedan interactuar con los sistemas biológicos con la finalidad de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del organismo. Uno de los padecimientos más comunes para tratar son los defectos óseos, que son la pérdida total o parcial de un elemento del sistema esquelético. Una de las técnicas para solucionar este tipo de problemas es por medio de la regeneración ósea guiada (GBR) que tiene como objetivo primordial promover la formación de nuevo hueso, mientras se les da preferencia a las células osteoblásticas y angiogénicas de la médula ósea adyacente, para poblar el área y permitir su crecimiento mediante la interacción con la matriz del injerto [1].

Según O'Brien (2011) [2], los bioinjertos deben tener algunas características para ser un excelente injerto, como biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, poros interconectados y alta porosidad. Estos factores son importantes para que las células se adhieran y migren a la superficie para funcionar normalmente y puedan reemplazar eventualmente al injerto para generar su propia matriz extracelular, por lo que también debe existir un ambiente adecuado para permitir la distribución de productos de desecho de las células fuera de la matriz. Los bioinjertos se pueden clasificar según distintos criterios como: 1. Estructura o 2. Fuente de obtención. La clasificación por estructura [3] se divide en el tipo de hueso que puede aplicar, ya sea: 1. Compacto (cortical), que está constituido por capas concéntricas de laminillas que forman estructuras cilíndricas llamadas osteonas, ó 2. Esponjoso (trabecular), que son laminas intersticiales que se disponen de forma irregular formando unas placas llamadas trabéculas. La clasificación por fuente de obtención se divide en: 1. Aloinjertos, 2. Autoinjertos y 3. Xenoinjertos.

Los aloinjertos son tejidos que se trasplantan de un individuo a otro, lo que implica una interacción del componente orgánico (ADN, sangre, grasas, proteínas, etc.) que puede causar rechazo, debido a una reacción inmunológica si el individuo no tiene una relación genética con el donante. Por este motivo, para realizar este tipo de trasplante, se deben realizar

diferentes pruebas de histocompatibilidad entre el donante y el receptor, lo que es una desventaja para este tipo de procedimiento, debido al tiempo y al riesgo de rechazo [4,5]. Un autoinjerto es un trasplante de una parte del cuerpo a otra en la misma persona [5]. La gran ventaja es que no hay rechazo inmunológico ya que el mismo individuo es el donante y el receptor. Sin embargo, los limitados sitios de recolección y la cantidad de material de injerto aumentan el tiempo de recuperación, haciendo que los pacientes duden en aceptar el uso de autoinjertos. Los xenoinjertos son injertos tomados de un donante de otra especie. Actualmente, los donantes más comunes son los huesos de bovino [6-9], porcino [10], caprino [11] entre otros. Estos productos deben pasar por diferentes procesos de manipulación y métodos de purificación para eliminar todos los componentes orgánicos de una fuente ósea original y dejar sola la matriz mineral.

La hidroxiapatita (HAp) es un material que pertenece al grupo de los apatito-(CaOH) con fórmula química:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , tiene una relación molar estequiométrica de Ca/P de 1.67 y posee una estructura cristalográfica de forma hexagonal. La hidroxiapatita tiene dos principales fuentes de obtención: a) sintética o b) natural. La forma sintética es obtenida generalmente a partir de fosfatos dicálcicos y tricálcicos a través de un proceso de síntesis; sin embargo, presenta una baja porosidad y resistencia mecánica, y alta solubilidad [12]. La hidroxiapatita de origen animal (biogénicas) también llamadas bio-hidroxiapatitas (BIO-HAp), se extraen de animales vertebrados (bovino, porcino, humano, peces, etc.). La BIO-HAp es un material no estequiométrico debido a la presencia de iones de sustitución en su estructura:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  [13,14], lo que le confiere una mayor biocompatibilidad ya que lo hace un material de mayor semejanza al tejido óseo humano tanto en su forma estructural, como química. Comúnmente, los huesos para la obtención de BIO-HAp se tratan mediante tres tipos de metodologías: descomposición térmica (incineración) [6-10], agua subcrítica [7,15] y proceso hidrotermal alcalino [7]. Todas estas técnicas se utilizan para eliminar la fase orgánica que incluye colágeno, ácidos grasos, fosfolípidos y proteínas sin colágeno.

El presente trabajo se desarrolló usando dos metodologías para la obtención de los nanosistemas híbridos. La primera metodología se realizó a partir de hueso cortical de fémur de origen porcino; el cual se le realizó una limpieza primaria que constó de eliminar en la medida de lo posible la presencia de componentes orgánicos provenientes del animal huésped por medio limpieza manual y un proceso hidrotérmico (agua destilada por 4 horas a 100 °C). Luego se aplicó una limpieza secundaria que consiste en usar soluciones alcalinas (KOH y NaOH; 1M) para desengrasar y desproteinizar la matriz mineral. En seguida se usó sonoquímica (4 tiempos: 10,20,30 y 60 minutos; 1 Potencia: 100 Watts) para reducir el tamaño del aglomerado de BIO-HAp a escala nanométrica.

Posteriormente, se efectuó la segunda metodología, la cual consiste en realizar la síntesis de la hidroxiapatita (HAp Syn) de origen sintético por medio de precipitación química usando fosfato monobásico de amonio ((NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y nitrato de calcio (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O) como precursores químicos e incorporando las nanopartículas de BIO-HAp como semillas de nucleación y controlando un pH de 9 con hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH). Finalmente, la caracterización de las muestras se llevó por medio de espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) y Análisis Termogravimétrico dual (TGA/DCS) para ver la eliminación de grasas y proteínas. El tamaño de partícula se efectuó por Dispersión Dinámica de Luz (DLS). El análisis morfológico se estudió mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM). El análisis de Difracción de Rayos X (DRX) sirvió para identificar las fases minerales y la orientación cristalina. Y, por último, se usó Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) para estudiar el arreglo cristalino y determinar las posibles orientaciones cristalinas preferenciales.

## II. JUSTIFICACIÓN

En estadísticas preliminares del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) tan solo en 2018 se realizaron un total de 1,400,553 intervenciones quirúrgicas de las cuales un total de 649,682 fueron lesiones de diversos tipos, sin embargo un total de 194,360 fueron relacionadas a traumatismos en extremidades y en cráneo y cara (fracturas, esguinces, luxaciones y contusiones) [16]. Debido a esta cantidad de intervenciones se estima que se necesitan aproximadamente 200,000 implantes ortopédicos (prótesis, placas, tornillos, etc.), para atender las necesidades hospitalarias públicas. No obstante, a este número se deben sumar las intervenciones odontológicas (públicas y privadas) y operaciones en hospitales privados, por lo que se considera que el número total de implantes y prótesis para cubrir la demanda nacional asciende a más de 550,000 implantes al año.

Para esta creciente demanda también se deben considerar varios factores externos que pueden afectar la cobertura del sector salud como lo son: 1. Los elevados precios de los insumos, 2. La escasez de donantes y 3. El frecuente rechazo del sistema inmune. Por lo que la bio-hidroxiapatita es un excelente material para considerar para usarlo como sustituto óseo o revestimiento de prótesis metálicas gracias a su alta biocompatibilidad y su bajo costo, ya que se puede obtener de un residuo como lo pueden ser los huesos de bovino, porcino, humano, peces, etc. Sin embargo, para realizar una completa introducción del material se necesita eliminar las grasas y proteínas de la matriz mineral del animal donante.

En México, ya existen varias compañías nacionales y extranjeras que venden comercialmente productos para bioinjertos (hidroxiapitas, precursores de Ca/P, etc.), pero debido a la mala regulación por parte de las autoridades no todas las marcas eliminan toda la cantidad de materia orgánica. En la investigación de Giraldo-Betancur et al. (2013) [14] encontraron que hay productos comerciales con presencia de componente orgánica, lo cual podría ocasionar reacciones alérgicas. De igual forma, se observaron que algunas muestras se sintetizaron y sinterizaron usando métodos térmicos para eliminar al 100% la presencia orgánica usando temperaturas entre 400 °C a 1200 °C, lo que ocasiono un proceso de coalescencia en los cristales de hidroxiapatita y aumento su tamaño.

Dicha transformación afecta el tamaño nanométrico natural del cristal como lo demostró Londoño-Restrepo et al. (2019) [13] en su investigación, al calcinar a múltiples rangos de temperaturas y observando los cambios por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). El fenómeno de coalescencia en la hidroxiapatita podría generar tardanza en la recuperación debido a que las células óseas no asimilan el tamaño macrométrico del cristal, o pueden incluso ocasionar un encapsulamiento al reconocerlo como un cuerpo extraño generando una reintervención quirúrgica para solucionar el problema.

En virtud de estos problemas de ciencia básica, esta investigación se centra en estudiar y aplicar una metodología alterna que nos permitan obtener BIO-HAp libre de componente orgánico y de tamaño nanométrico. Así como estudiar si la BIO-HAp puede ser afín de mezclarse con la HAp sintética para posibles aplicaciones médicas en implantes con recubrimientos a temperatura ambiente que puedan ayudar a solucionar los problemas técnico-científicos y comerciales.



### III. HIPÓTESIS

Revisiones bibliográficas e investigaciones previas dentro del grupo de investigación, permitieron proponer que: “Disminuyendo el tamaño de partícula de la bio-hidroxiapatita (BIO-HAp) obtenida de hueso porcino a escala nanométrica, se podrá utilizar como semilla de nucleación para sintetizar hidroxiapatita sintética, debido a los iones sustitucionales de la BIO-HAp ( $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Cl^-$ ,  $F^-$ ,  $K^+$ ,  $Fe^{2+}$ )” serán afines a la estructura, permitiéndole su cristalización.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Sintetizar y caracterizar nanoestructuras híbridas de bio-hidroxiapatita (BIO-HAp) / hidroxiapatita sintética (HAp) mediante fuentes biogénicas asistido por sonoquímica y precipitación química para posibles aplicaciones médicas.

### 4.2. Objetivos específicos

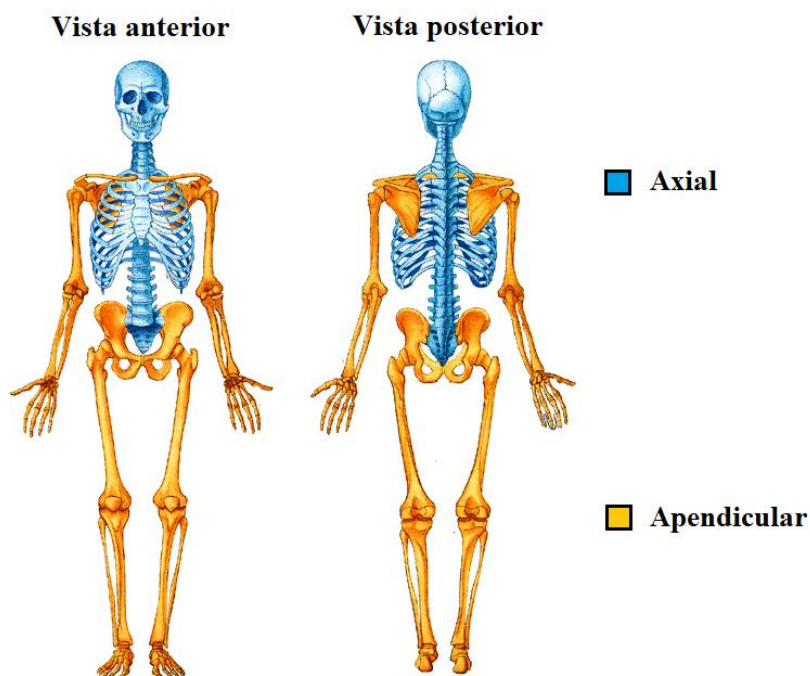
- Diseñar e implementar una metodología para la obtención de nano BIO-HAp a partir de una fuente biogénica como el hueso de porcino usando una limpieza alcalina con KOH y NaOH.
- Analizar las muestras por Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) y Análisis Termogravimétrico (TGA) para observar la eliminación de grasas y proteínas nativas del hueso.
- Realizar pruebas de sonoquímica para encontrar los parámetros óptimos para producir nanopartícula en la BIO-HAp (semillas).
- Caracterizar el tamaño de partícula de las semillas de BIO-HAp por medio de Espectroscopia de Dispersión Dinámica de Luz (DLS).
- Sintetizar HAp sintética a través de precipitación química incorporando las nanopartículas de BIO-HAp.
- Estudiar la morfología y microestructura mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).
- Examinar las nanopartículas mediante Difracción de Rayos X (XRD) para identificar las fases minerales y la orientación cristalina.
- Obtener por medio de Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) el arreglo cristalino para determinar las posibles orientaciones cristalinas preferenciales.

## V. MARCO TEÓRICO

### 5.1. Tejido óseo

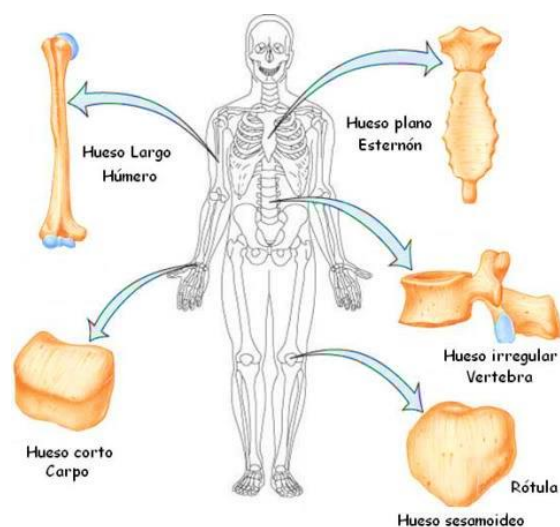
El tejido óseo es un tejido conjuntivo, parte fundamental del aparato locomotor, es el armazón que soporta nuestro cuerpo, protege nuestros órganos y permite nuestros movimientos. El tejido óseo está compuesto de órganos llamados huesos que constituyen el sistema esquelético [17]. El aparato esquelético de un humano adulto consta de 206 huesos y representa alrededor del 12% del peso total del cuerpo [18]. El esqueleto humano se divide en dos partes:

- Esqueleto axial: cráneo, columna vertebral, costillas y esternón (80 huesos; *Figura 1*, azul).
- Esqueleto apendicular: miembros superior e inferior junto con la cintura escapular y pelviana (126 huesos; *Figura 1*, amarillo).



**Figura 1.** Esqueleto humano.

Los huesos poseen una gran resistencia a la tracción y a la compresión, cierta elasticidad y una arquitectura ligera eficaz. Es un material dinámico que sufre un recambio notable de sustancias, está muy bien irrigado y se remodela en forma continua. El hueso es un componente vivo, heterogéneo y altamente anisótropo. Los huesos se clasifican según su forma en cuatro grupos principales [19]:



**Figura 2.** Tipos de hueso según su forma.

- Huesos largos: tiene una longitud mayor que las otras dos dimensiones y están compuestos por un diáfisis y dos epífisis (tibia y los metacarpianos)
- Huesos cortos: tiene sus tres dimensiones casi iguales (huesos del carpo).
- Huesos planos: son delgados y anchos (huesos de la calota craneana y el esternón).
- Huesos irregulares: poseen una forma que no permite clasificarlos dentro de ninguno de los tres grupos anteriores; la forma puede ser compleja (vertebras y etmoides).

El hueso esta su vez este compuesto estructuralmente de dos tipos de hueso [18]:

- Hueso compacto: es hueso denso que forma la capa externa de todos los huesos y rodea el hueso esponjoso.
- Hueso esponjoso: consiste en trabéculas que encierran cavidades que contienen células formadoras de sangre (médula).

### Hueso Compacto y Esponjoso

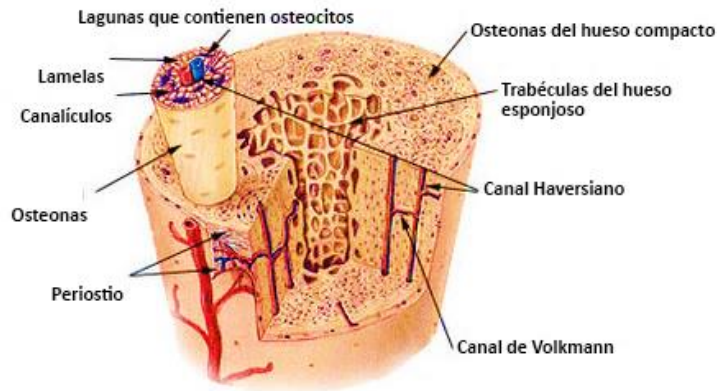


Figura 3. Estructura del hueso (compacto y esponjoso).

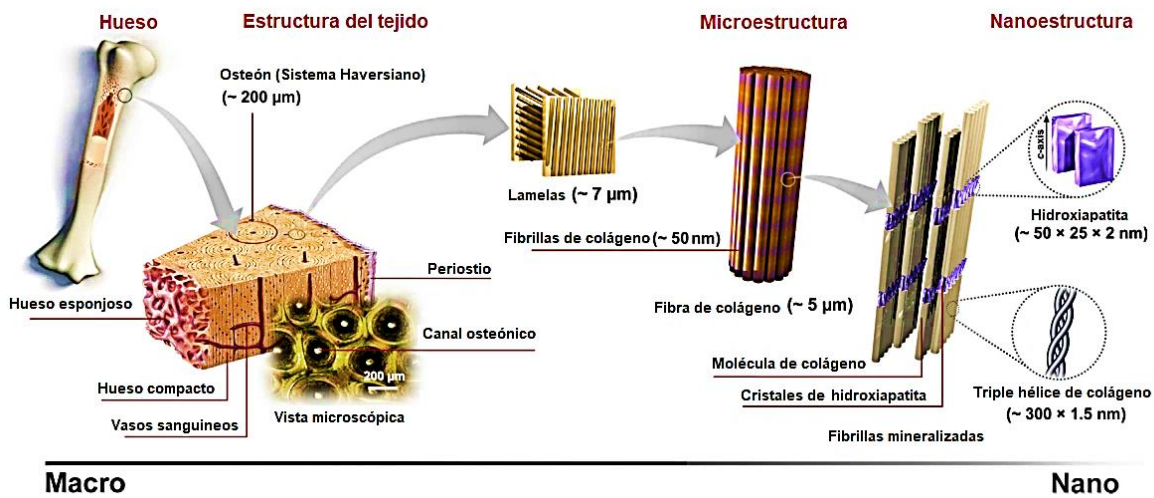


Figura 4. Estructura jerárquica del hueso en varias escalas de longitud.

Los niveles jerárquicos del hueso se encuentran diseñados en varias escalas de nano a macro con el fin de cumplir múltiples funciones; inician con los cristales de fosfatos de calcio alineados en las fibras de colágeno que a su vez se disponen en capas concéntricas paralelas alrededor de los vasos sanguíneos llamadas lamelas que forman las osteonas. Las osteonas se encuentran densamente empacadas formando hueso compacto que constituye alrededor del 80% del hueso o una red trabecular de hueso microporoso que ocupa cerca del 20% del hueso total, originando así las fases de hueso cortical y esponjoso o trabecular [20].

En principio, el hueso es un material compuesto conformado por tres tipos de matriz:

1. Orgánica
2. Celular
3. Mineral (Inorgánica)

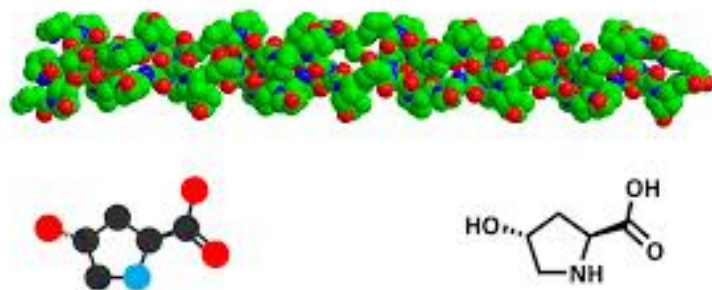
El hueso a través de la unión de las tres matrices anteriormente citadas logra tener una función metabólica central, a saber, el almacenaje de calcio. El calcio es un ión esencial en muchas funciones del organismo (contracción muscular, secreción y coagulación de la sangre, entre muchas otras) [17]. Además, en el hueso se almacenan magnesio, fósforo, sodio y otros iones que se insertan en su estructura dándole propiedades únicas. La composición y la estructura de los huesos están sujetas a influencias hormonales, metabólicas y nutricionales múltiples.

### ***5.1.1. Matriz orgánica***

El hueso dentro su composición está formada por células y sustancia extracelular. Las células representan únicamente el 2% del tejido, mientras que la matriz extracelular es el 98% y esta a su vez está formada por 70% por sustancias inorgánicas ricas en calcio y fósforo y en un 30% por materia orgánica, principalmente fibras de colágeno. (Ver *Figura 4*). Los principales componentes estructurales de la matriz ósea como se mencionó son el colágeno de tipo I y, en menor medida, el colágeno de tipo V. En la matriz también se han encontrado vestigios de otros tipos de colágeno, como los tipos III, XI y XIII. Todos los colágenos constituyen alrededor del 90% del peso total de las proteínas de la matriz ósea. La matriz también contiene otras proteínas no colágenas que forman la sustancia fundamental del tejido óseo. Como componentes menores del tejido, dado que constituyen solo el 10% del peso total de las proteínas de la matriz ósea, son indispensables para el desarrollo, el crecimiento, el remodelado y la reparación del hueso.

Tanto el colágeno como los componentes de la sustancia fundamental se mineralizan para formar el tejido óseo. Los cuatro grupos principales de proteínas no colágenas que hay en la matriz ósea son [19]:

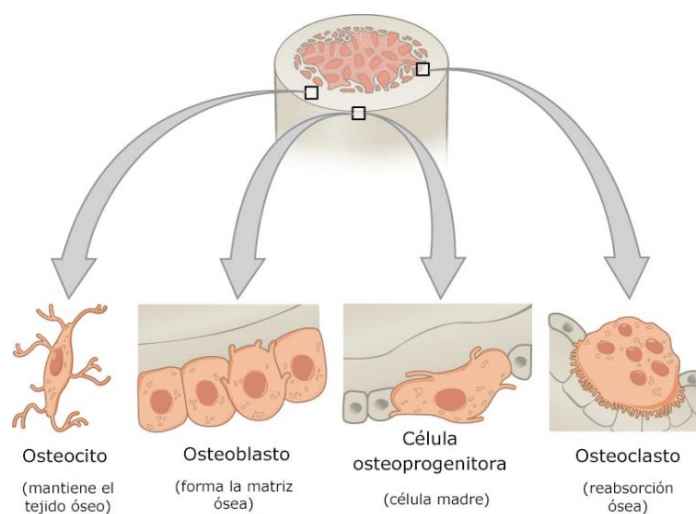
- Macromoléculas de proteoglicanos, contienen una proteína central con cantidades diversas de cadenas laterales de glucosaminoglicanos (hialuronano, condroitin sulfato y queratán sulfato) unidos en forma covalente. Contribuyen a que el tejido óseo ofrezca resistencia a la compresión. También tiene a su cargo la fijación de los factores de crecimiento e inhibirían la mineralización.
- Glucoproteínas multiadhesivas, que actúan en la adhesión de las células óseas y las fibras colágenas a la sustancia fundamental mineralizada. Algunas de las glucoproteínas más importantes son la osteonectina (que sirve como adhesivo entre el colágeno y los cristales de hidroxapatita) y sialoproteínas como la osteopontina ( que media la adhesión de las células a la matriz ósea) y las sialoproteínas I y II (que median la adhesión celular e inician la formación de fosfato de calcio durante el proceso de mineralización).
- Proteínas dependientes de la vitamina K osteoespecíficas, que incluyen la osteocalcina (que captura el calcio desde la circulación y atrae y estimula los osteoclastos en el remodelado óseo, la proteína S y la proteína Gla matricial (MGP).
- Factores de crecimiento y citocinas, que son proteínas reguladoras pequeñas entre las que se encuentran los factores de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), el factor de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), las proteínas morfogénicas óseas (BMP) y las interleucinas (IL-1, IL-6). Los miembros más singulares este grupo son las BMP porque inducen la diferenciación de las células mesenquimáticas en osteoblastos, las células formadoras de tejido óseo. La BMP7 humana recombinante, también conocida como proteína osteogénica 1 (OP-1), ahora se utiliza clínicamente para inducir el crecimiento óseo después de ciertas cirugías que implican una pérdida importante de masa ósea, de fusiones columnares o de la implantación de materiales de injerto.



**Figura 5.** Molécula de Colágeno.

### 5.1.2. Matriz celular

En la matriz ósea contiene espacios llamados lagunas u osteoplastos cada uno de los cuales contiene una célula ósea u osteocito (Ver *Figura 3*). El osteocito extiende una gran cantidad de prolongaciones en túneles estrechos denominados canalículos. Los canalículos atraviesan la matriz mineralizada para conectar las lagunas antiguas y permitir el contacto entre las prolongaciones de osteocitos vecinos. De esta manera se forma una red continua de canalículos y lagunas con células y sus prolongaciones en toda la masa del tejido mineralizado [19]. El tejido óseo depende de los osteocitos para mantener su viabilidad. Además de los osteocitos, en el tejido óseo hay otros cuatro tipos celulares, a saber:



**Figura 6.** Tipos de células óseas.



- Células osteoprogenitoras, que son células derivadas de las células madre mesenquimáticas que da origen a los osteoblastos.
- Osteoblastos, que son células que secretan la matriz extracelular del tejido óseo; una vez que la célula queda rodeada por la matriz secretada pasa a llamarse osteocito.
- Células de revestimiento óseo, que permanecen en a superficie ósea cuando hay un crecimiento activo. Derivan de los osteoblastos que quedan después de cese del depósito óseo.
- Osteoclasto, que son células de resorción ósea presentes en superficie óseas en las que el hueso se está eliminando o remodelando (reorganizando) o donde el hueso ha sido lesionado.

### ***5.1.3. Matriz mineral***

La matriz ósea mineral contiene abundantes sales en forma cristalizada, en particular la hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  y algo de carbonato cálcico. Los cristales aciculares de apatita miden unos 40 nm de largo y 1.5-3 nm de ancho. La mineralización comienza en el colágeno, donde inicialmente se depositan los cristales de hidroxiapatita en intervalos regulares. Hasta el momento se desconocen los factores que determinan la mineralización in vivo. Se supone que las proteínas óseas osteocalcina, osteonectina y osteopontina desempeñan un papel en la formación de los cristales de apatita. Al parecer otro mecanismo de calcificación consiste en la formación de vesículas pequeñas que contienen apatita y brotan de la superficie de los osteoblastos. Además, en la matriz inorgánica hay cantidades pequeñas se encuentran iones de citrato, carbonato, sulfatos, fluoruros e hidróxido de magnesio [17], la presencia de estas trazas contribuye al ciclo de vida del tejido duro puesto que influencia reacciones bioquímicas relacionadas con el metabolismo óseo. El grupo hidroxilo de la apatita con frecuencia es reemplazado por un ion fluoruro. Aunque la dureza del hueso se debe a sus componentes minerales, sin la existencia de la red de colágeno, el hueso sería frágil, por lo que el colágeno proporciona soporte mecánico y sirven como reservorio de minerales [21].

## 5.2. Hidroxiapatita

La hidroxiapatita (HAp) es un mineral perteneciente al grupo de las apatitas (conformado por fosfatos, arseniatos y vanadatos con estructuras hexagonales o monoclinicas pseudo-hexagonales). Apatita es el nombre para la cloroapatita, fluorapatita e hidroxiapatita y en general presentan la siguiente fórmula:  $A_5(BO_4)_3(OH, F, Cl)$ , donde A corresponde a diferentes cationes metálicos como calcio (Ca), Bario (Ba), sodio (Na), plomo (Pb) entre otros; en cuanto a los cationes B, puede ser fósforo (P), vanadio (V) o arsénico (As) [22]. La HAp estequiométrica presenta una fórmula química  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  y con una relación de Ca/P de 1.67. En la estructura de la hidroxiapatita se encuentran alojados dos tipos de Ca de acuerdo con el ambiente químico. El Ca (1) presenta número de coordinación 9, donde los sitios se encuentran todos ocupados por átomos de oxígeno dando lugar a la formación de un prisma triangular triplicado y el Ca (2) con número de coordinación 7 representa una bipirámide pentagonal.

A nivel cristalográfico, la HAp presenta carácter iónico y un empaquetamiento hexagonal compacto, en donde los oxígenos ocupan los huecos tetraédricos y octaédricos con grupo espacial P63/m con parámetros de red:  $a = b = 9.418\text{Å}$  y  $c = 6.884\text{Å}$  [12]. La HAp presenta numerosas sustituciones que impiden que permanezca en su forma estequiométrica. El carácter iónico de la HAp la convierte en una cerámica dura, refractaria y con punto de fusión superior a los 1500 °C, además permite la ya mencionada sustitución parcial o completa de iones de la red por otros que tengan un tamaño similar y también es responsable de su insolubilidad [23].

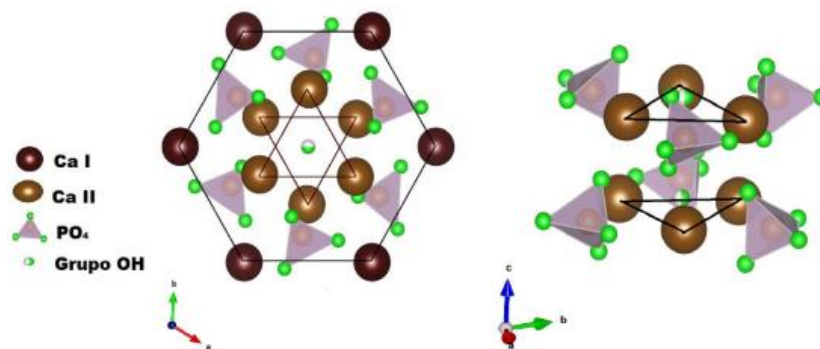


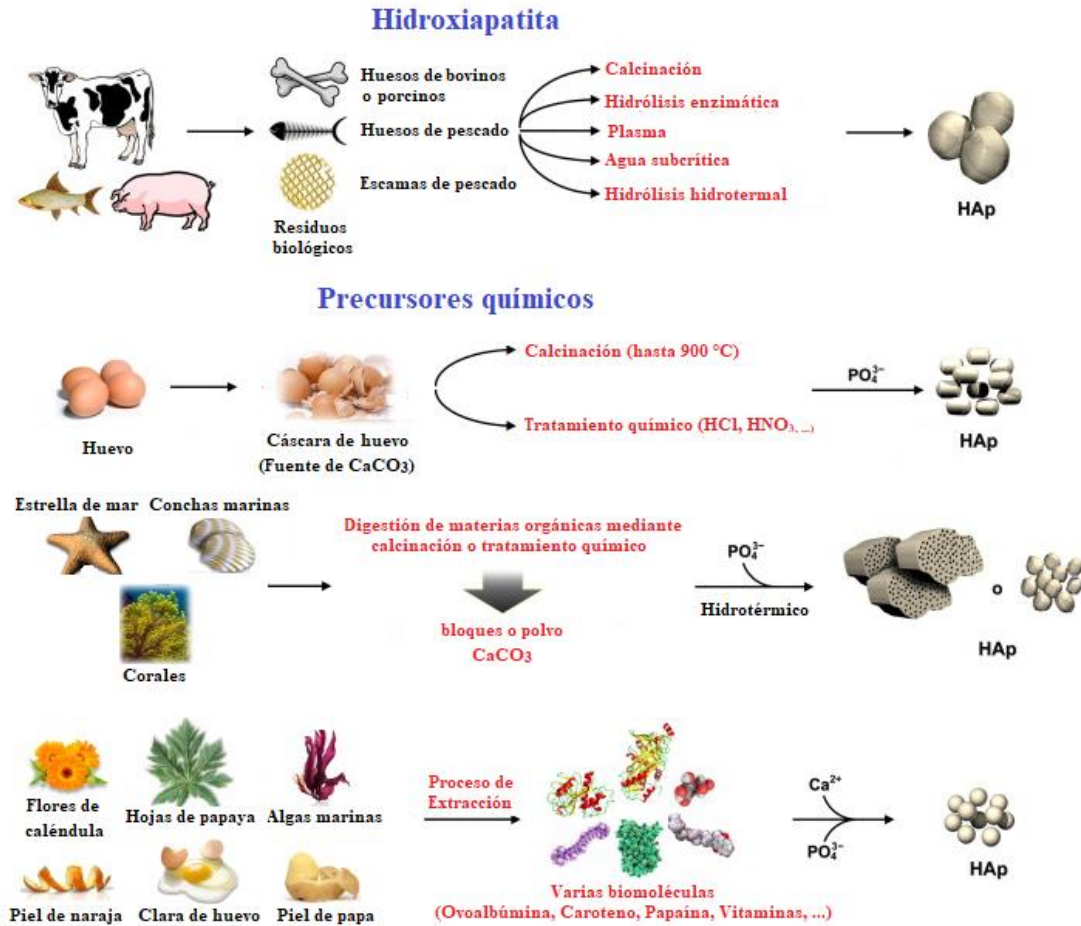
Figura 7. Representación cristalográfica de la hidroxiapatita.

Actualmente se cuenta con múltiples estudios relacionados con métodos de fabricación de HAp con tamaños micrométricos ( $>1 \mu\text{m}$ ) pero recientemente se ha centrado la atención en HAp nanométrica (10-100 nm) ya que presenta mejores propiedades funcionales con respecto a la anteriormente mencionada como por ejemplo, mejor reactividad superficial y estructura ultra fina que resultan fundamentales en la interacción tejido-injerto una vez realizado el implante; además se demostró que la nano-HAp en comparación con la micro-HAp fomenta la adhesión, diferenciación y proliferación de osteoblastos, la deposición de minerales y la osteointegración, lo que lleva a una mejora en la formación del nuevo tejido óseo [24].

### **5.2.1. Tipos de hidroxiapatita**

#### **5.2.1.1. Natural**

La hidroxiapatita natural generalmente se extrae de fuentes biológicas o desechos como huesos de mamíferos (bovinos [6-9], porcinos [10], caprinos [11] camellos [25] entre otros.), fuentes marinas o acuáticas (espina de pescado [26] y escamas de pescado), fuentes de cáscara (berberechos, almejas, cáscaras de huevo [27] y concha marina [28].), fuentes minerales (piedra caliza [29]) y fuentes vegetales (flores de caléndula, piel de papa o naranja, hojas de papaya y algunas algas marinas [30]). La *Figura 8* muestra las fuentes y ejemplos de técnicas utilizadas para sintetizar HAp natural. La HAp natural a comparación con la hidroxiapatita sintética, no es estequiométrica y es deficiente en calcio o fósforo esto debido a que las posiciones de calcio es sustituida por iones como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Al}^{3+}$ , mientras que los iones carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) pueden sustituir a los iones fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) o hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ), mientras que los iones fluoruro ( $\text{F}^-$ ) sustituyen a los iones hidroxilo [13,14]. La presencia de estas trazas de algunos elementos dentro de las hidroxiapatitas naturales imita la apatita producida por el hueso humano. Por lo que estos iones sustitucionales son esenciales en la regeneración del hueso y aceleran el proceso de formación ósea.



**Figura 8.** Fuentes de obtención de BIO-HAp y precursores químicos naturales.

Muchas veces después de obtener la materia prima el siguiente paso es utilizar un método alternativo para eliminar la grasa, proteína y materiales genético de la matriz mineral en caso de huesos (hidroxiapatita pura) o combinar compuestos ricos en iones de  $\text{Ca}^{2+}$  o grupos fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) para las fuentes de obtención que generan precursores químicos naturales. Por lo que a continuación se enlistan algunas metodologías para dicha función [31]:

- Huesos vertebrados (hidroxiapatita):
  - Calcinación
  - Hidrólisis alcalina
  - Hidrólisis enzimática
  - Plasma
  - Hidrólisis hidrotermal

- Precursores químicos:
  - Precipitación sol-gel
  - Pirólisis
  - Mecanoquímico
  - Precipitación química
  - Irradiación de microondas
  - Irradiación ultrasónica

### 5.2.1.2. Sintética

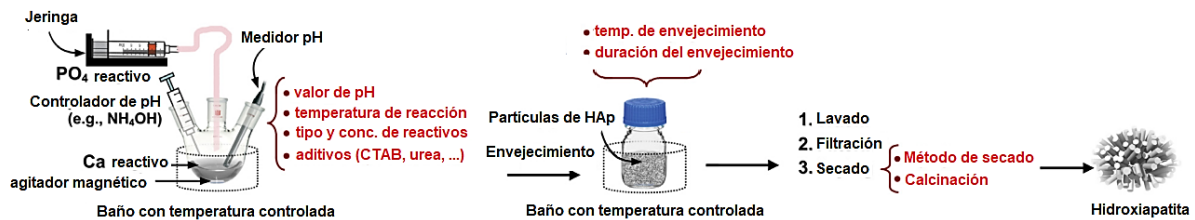
Dentro de la naturaleza se pueden extraer compuestos naturales como lo mencionamos en anteriormente y usarlos para síntesis de hidroxiapatita, entre las fuentes de calcio que pueden ser empleadas para la elaboración están las soluciones acuosas de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), nitrato de calcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) y acetato de calcio ( $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ); y como fuentes de fósforo se encuentran, fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato monobásico de amonio ( $\text{NH}_4(\text{H}_2\text{PO}_4)$ ), fosfato dibásico de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ) entre otros [32]. Entre los métodos empleados para la síntesis de hidroxiapatita sintética se encuentran tres clasificaciones de métodos (Ver 5.2.1.1. *Natural*):

Método		Aspectos de procesamiento		Características del polvo					
		Número de productos químicos	Costo	Morfología	Grado de cristalinidad	Pureza de fase	Relación Ca / P	Tamaño	Distribución de tamaño
Métodos secos	Métodos de estado sólido	Pocos	Bajo	Diverso	Muy alto	Generalmente bajo	Variable	Generalmente micrométrico	Amplia
	Métodos mecanoquímicos	Pocos	Bajo	Diverso	Muy alto	Bajo	Generalmente no estequiométrico	nanométrico	Generalmente amplia
Métodos húmedos	Precipitación química	Frecuentemente pocos	Bajo	Diverso	Frecuentemente bajo	Variable	No estequiométrico	Generalmente nanométrico	Variable
	Métodos de hidrólisis	Pocos	Generalmente alto	Diverso	Variable	Generalmente alto	Estequiométrico	Variable	Variable
	Métodos sol-gel	Variable	Variable	Diverso	Variable (generalmente bajo)	Variable	Estequiométrico	nanométrico	Estrecha
	Métodos hidrotermales	Variable	Generalmente alto	Frecuentemente como agujas	Muy alto	Generalmente alto	Estequiométrico	nanométrico o micrométrico	Generalmente amplia
	Emulsión	Muchos	Alto	Frecuentemente como agujas	Frecuentemente bajo	Variable	No estequiométrico	nanométrico	Estrecha
	Métodos sonoquímicos	Pocos	Generalmente bajo	Diversos (generalmente agujas)	Variable	Generalmente alto	Variable	nanométrico	Generalmente estrecho
Proceso de alta temperatura	Métodos de combustión	Pocos	Generalmente bajo	Diversos (generalmente irregulares)	Variable	Generalmente alto	Variable	Generalmente nanométrico	Amplia
	Métodos de pirólisis	Variable	Generalmente bajo	Diverso	Alto	Variable	Generalmente estequiométrico	Nanopartículas incrustadas en agregados micrométricos	Variable
	Síntesis de fuentes biogénicas	Pocos	Generalmente bajo	Diverso	Variable	Generalmente alto	Variable	Variable	Variable
	Procedimientos de combinación	Variable	Variable	Diversos (generalmente agujas)	Frecuentemente alto	Generalmente alto	Generalmente estequiométrico	Generalmente nanométrico	Variable

**Tabla 1.** Comparación de diferentes métodos para la preparación de hidroxiapatita.

- Métodos secos:
  - Método de estado sólido
  - Método mecanoquímico
- Métodos húmedos:
  - Precipitación química
  - Método de hidrólisis
  - Método Sol-gel
  - Método hidrotermal
  - Emulsión
  - Método sonoquímico
- Procesos de alta temperatura:
  - Método de combustión
  - Método de pirólisis
  - Procedimientos de combinación
  - Síntesis de fuentes biogénicas

### 5.3. Síntesis por precipitación química (HAp)

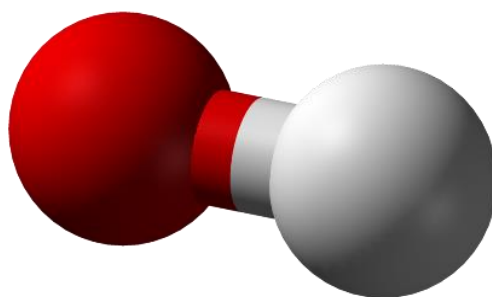


**Figura 9.** Preparación de HAp mediante precipitación química.

Anteriormente se enlistaron varios métodos para la obtención de hidroxapatita según Sadat-Shojai et al. (2013) [32], pero cada uno de ellos tienen parámetros variables que afectan la síntesis como son: 1) Número de reactivos, 2) Costos, 3) Morfología, 4) Tamaño de cristal, 5) Relación Ca/P y 6) Tamaño, como se muestran en la *Tabla 1*. Los métodos húmedos se han aplicado convencionalmente a la preparación de partículas de HAp que tienen una estructura de tamaño nanométrico con una morfología regular y suelen ser naturales y las condiciones de crecimiento se pueden controlar directamente ajustando los parámetros de reacción. La precipitación química de hidroxapatita se efectúa al descomponer dos compuestos que contienen Ca y P mediante un precursor alcalino y controlando concentración, temperatura, pH y tiempo.

La precipitación como concepto es la creación de un sólido a partir de una solución. Cuando la reacción ocurre en una solución líquida, el sólido formado se llama el "precipitado". La sustancia química que hace que se forme el sólido se llama "precipitante". Sin suficiente fuerza de gravedad (sedimentación) para unir las partículas sólidas, el precipitado permanece en suspensión. Después de la sedimentación, especialmente cuando se usa una centrifuga para presionarla en una masa compacta, el precipitado se puede denominar "gránulo". La precipitación se puede utilizar como medio. El líquido libre de precipitados que queda sobre el sólido se llama "sobrenadante" o "sobrenadante".

#### 5.4. Hidrólisis alcalina hidrotérmica



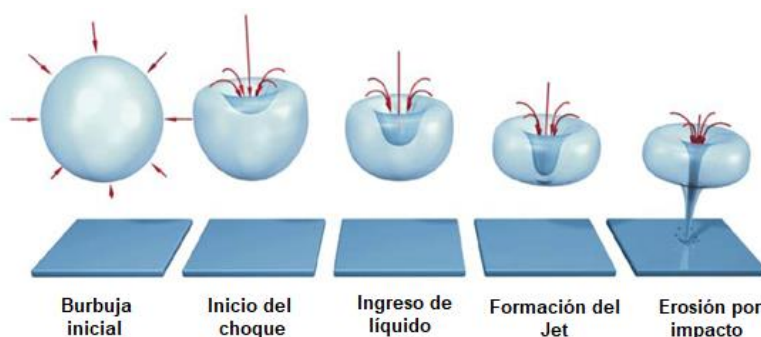
**Figura 10.** Representación de un ion hidróxido (OH<sup>-</sup>).

La hidrólisis alcalina hidrotérmica es un procedimiento en el cual por medio de una reacción química y temperatura una molécula de agua rompe uno o más enlaces químicos, en este caso es una sustitución nucleofílica en las que el nucleófilo atacante es un ion hidróxido (OH<sup>-</sup>). La reacción a menudo se usa para convertir la materia orgánica (grasas, aceites y proteínas) sólida en una forma líquida para facilitar su eliminación, esto debido a que el ion hidróxido al quedar libre interactúa con las moléculas y proteínas cambiando sus grupos funcionales, rompiendo y modificando su química superficial, lo que genera una intensa degradación a agua y material soluble (proteínas más cortas) [7,33]. Algunos ejemplos de soluciones alcalinas que se usan para este tipo de proceso incluyen: a) Hidróxido de sodio, b) Hidróxido de potasio, c) Hidróxido de magnesio y d) Carbonato de calcio.



## 5.5. Sonoquímica

La sonoquímica es una rama de la investigación química, que se ocupa de los efectos químicos y las aplicaciones de la comprensión del efecto del ultrasonido en la formación de cavitación acústica en líquidos, lo que resulta en el inicio o la mejora de la actividad química en la solución [34]. Por lo tanto, los efectos químicos del ultrasonido no provienen de una interacción directa de la onda de sonido ultrasónica con las moléculas en la solución. Las ondas de sonido que se propagan a través de un líquido a frecuencias ultrasónicas lo hacen con una longitud de onda que es dramáticamente más larga que las dimensiones moleculares o la longitud del enlace entre los átomos en la molécula. Por lo tanto, la onda de sonido no puede afectar la energía vibratoria del enlace y, por lo tanto, no puede aumentar directamente la energía interna de una molécula.



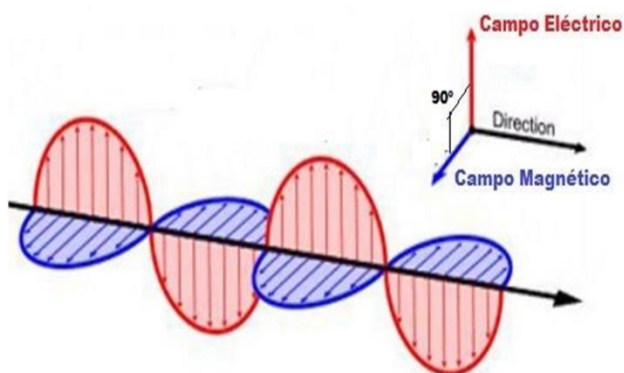
**Figura 11.** Proceso de cavitación por ultrasonido en una burbuja.

En cambio, la sonoquímica surge de la cavitación acústica: la formación, el crecimiento y el colapso implosivo de burbujas en un líquido [35]. El colapso de estas burbujas es un proceso casi adiabático, lo que resulta en una acumulación masiva de energía dentro de la burbuja, lo que resulta en temperaturas y presiones extremadamente altas en una región microscópica del líquido sonicado. Las altas temperaturas y presiones dan como resultado la excitación química de cualquier materia que se encuentre entorno inmediato de la burbuja, ya que implosionó rápidamente. Una amplia variedad de resultados puede resultar de la cavitación acústica, incluida la sonoluminiscencia, el aumento de la actividad química en la solución debido a la formación de reacciones radicales, el aumento de la actividad química y la disminución de tamaño de partícula.



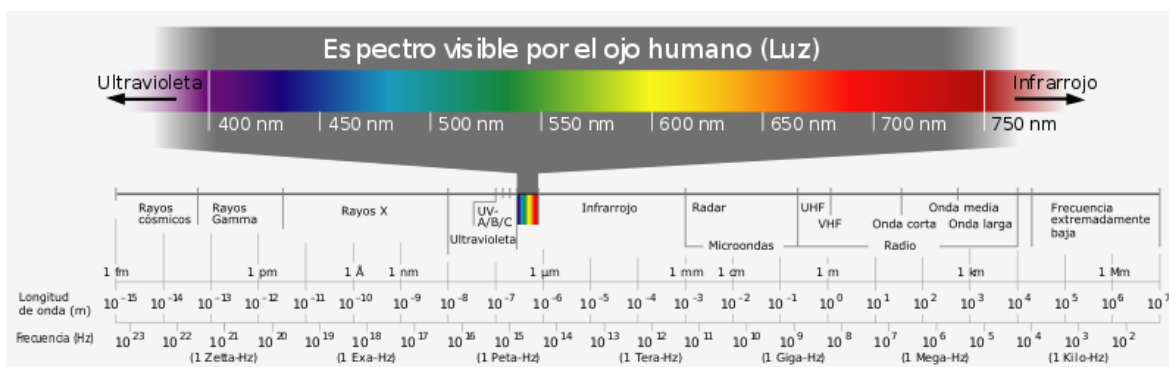
## 5.6. Técnicas de caracterización

### 5.6.1. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)



**Figura 12.** Representación en 3° dimensión de una onda electromagnética.

El término apropiado usado para describir la luz es radiación electromagnética. La luz está compuesta de ondas eléctricas y magnéticas llamadas vector eléctrico y vector magnético. Estas dos ondas se ondulan en planos perpendiculares entre sí y se mueven a través del espacio en una tercera dirección perpendicular a los planos de ondulación. Es la interacción del vector eléctrico con la materia lo que conduce a la absorbanza de la luz [36]. La amplitud del vector eléctrico cambia con el tiempo y tiene la forma de una onda sinusoidal como se muestra en la *Figura 12*. El infrarrojo (IR) pertenece a un tipo de radiación electromagnética, cuya colección se llama espectro electromagnético, el cual es una distribución energética.

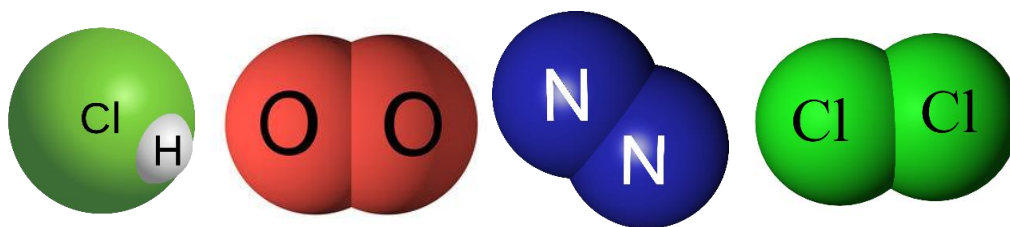


**Figura 13.** Espectro electromagnético.

La espectroscopía infrarroja aprovecha los fenómenos electromagnéticos para su funcionamiento, en específico de la longitud de onda del infrarrojo y es sin duda una de las técnicas analíticas más importantes disponibles para los científicos de hoy. Una de las grandes ventajas de la espectroscopía infrarroja es que se puede estudiar prácticamente cualquier muestra en prácticamente cualquier estado. Los líquidos, las soluciones, las pastas, los polvos, las películas, las fibras, los gases y las superficies se pueden examinar con una elección juiciosa de la técnica de muestreo. Como consecuencia de la instrumentación mejorada, se han desarrollado una variedad de nuevas técnicas sensibles para examinar muestras anteriormente intratables.

Los espectrómetros infrarrojos han estado disponibles comercialmente desde la década de 1940. En ese momento, los instrumentos se basaban en prismas para actuar como elementos dispersivos, pero a mediados de la década de 1950, las rejillas de difracción se habían introducido en máquinas dispersivas. Sin embargo, los avances más significativos en espectroscopía infrarroja se han producido como resultado de la introducción de espectrómetros de transformada de Fourier [37]. Este tipo de instrumento emplea un interferómetro y explota el proceso matemático bien establecido de la transformación de Fourier. La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) ha mejorado drásticamente la calidad de los espectros infrarrojos y ha minimizado el tiempo requerido para obtener datos. Además, con las constantes mejoras en las computadoras, la espectroscopía infrarroja ha avanzado aún más.

La radiación IR no es lo suficientemente energética como para provocar los tipos de transiciones electrónicas como la radiación UV y visible. Por lo tanto, la absorción de la radiación IR se limita en gran medida a especies moleculares que tienen pequeñas diferencias de energía entre varios estados vibratorios y rotacionales. Para absorber la radiación IR, una molécula debe experimentar un cambio neto en el momento dipolar a medida que vibra o gira. Solo bajo estas circunstancias, el campo eléctrico alterno de la radiación puede interactuar con la molécula y causar cambios en la amplitud de uno de sus movimientos.

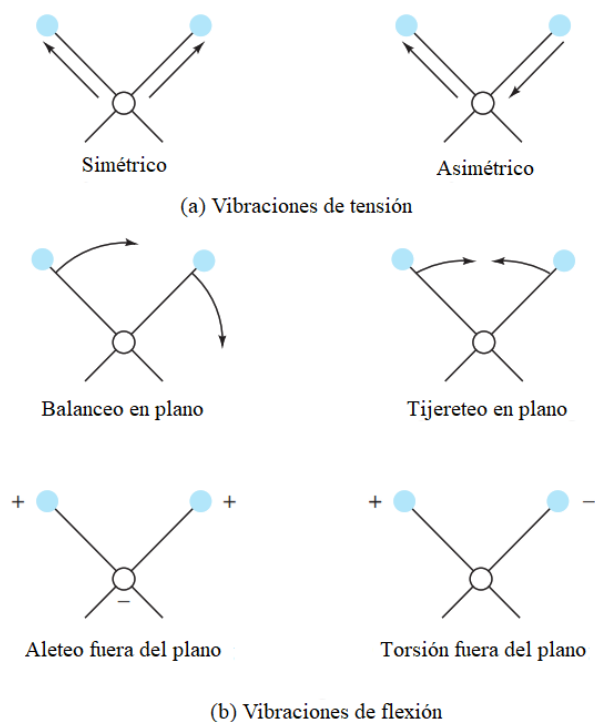


**Figura 14.** Ejemplo de moléculas: HCl, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y Cl<sub>2</sub>.

Por ejemplo, la distribución de carga alrededor de una molécula como el cloruro de hidrógeno (HCl) no es simétrica porque el cloro tiene una mayor densidad de electrones que el hidrógeno. Por lo tanto, el cloruro de hidrógeno tiene un momento dipolar significativo y se dice que es polar. El momento dipolar está determinado por la magnitud de la diferencia de carga y la distancia entre los dos centros de carga. A medida que vibra una molécula de cloruro de hidrógeno, se produce una fluctuación regular en su momento dipolar, y se establece un campo que puede interactuar con el campo eléctrico asociado con la radiación. Si la frecuencia de la radiación coincide exactamente con una frecuencia vibratoria natural de la molécula, se produce la absorción de la radiación que produce un cambio en la amplitud de la vibración molecular. De manera similar, la rotación de moléculas asimétricas alrededor de sus centros de masa da como resultado fluctuaciones periódicas de momento dipolar que permiten la interacción con el campo de radiación. No se produce un cambio neto en el momento dipolar durante la vibración o rotación de especies homonucleares como O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> o Cl<sub>2</sub>. Como resultado, tales compuestos no pueden absorber la radiación IR.

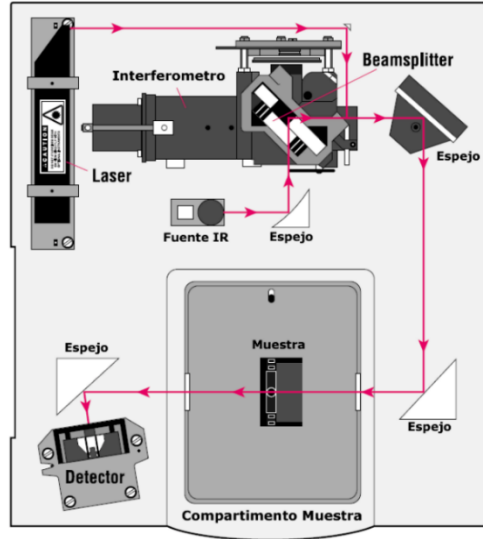
La energía requerida para causar un cambio en el nivel de rotación es bastante pequeña y corresponde a una radiación de  $\bar{\nu} \leq 100 \text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda > 100 \text{ }\mu\text{m}$ ). Debido a que los niveles de rotación se cuantifican, la absorción de gases en esta región de IR lejano se caracteriza por líneas discretas y bien definidas. En líquidos o sólidos, las colisiones e interacciones intramoleculares provocan la ampliación de las líneas en un continuo. Los niveles de energía vibracional también se cuantifican, y para la mayoría de las moléculas, las diferencias de energía entre los estados cuánticos corresponden a la región del IR medio. El espectro IR de un gas usualmente consiste en una serie de líneas muy cercanas, porque hay varios niveles de energía rotacional para cada nivel vibratorio. Por otro lado, la rotación está altamente

restringida en líquidos y sólidos; en tales muestras, desaparecen líneas discretas de rotación vibracional, dejando solo bandas vibratorias algo ensanchadas.



**Figura 15.** Tipo de vibraciones moleculares.

Las posiciones relativas de los átomos en una molécula no están fijas, sino que fluctúan continuamente debido a una multitud de diferentes tipos de vibraciones y rotaciones alrededor de los enlaces en la molécula. Para una molécula diatómica o triatómica simple, es fácil definir el número y la naturaleza de tales vibraciones y relacionarlas con las energías de absorción. Un análisis de este tipo se vuelve difícil, si no imposible, para las moléculas formadas por muchos átomos. Las moléculas grandes no solo tienen una gran cantidad de centros vibratorios, sino que también pueden producirse interacciones entre varios centros y deben tenerse en cuenta para un análisis completo. Las vibraciones caen en las categorías básicas de estiramiento (tensión) y flexión. Una vibración de tensión implica un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces y son de cuatro tipos: tijera, balanceo, aleteo y torsión. Estos se muestran esquemáticamente en la *Figura 15* [38].



**Figura 16.** Esquema de funcionamiento de un interferómetro de Infrarrojo.

En el caso de la técnica FT-IR, La mayoría de los instrumentos disponibles en el mercado se basan en el interferómetro de Michelson, aunque también se encuentran otros tipos de sistemas ópticos. Existen cuatro técnicas de muestreo principales para FT-IR [39]:

- Transmitancia
- Reflectancia total atenuada (ATR)
- Reflectancia difusa
- Reflexión especular

La técnica FT-IR puede ser una herramienta de un solo uso o un instrumento de investigación sumamente flexible. Si la técnica FT-IR se configura para el uso de un dispositivo de muestreo específico (por ejemplo, transmisión o ATR), el espectrómetro puede proporcionar una amplia variedad de información:

- En la mayoría de los casos, la identificación de una sustancia desconocida.
- Información cuantitativa, por ejemplo, sobre aditivos o contaminantes.
- Información sobre la cinética según el aumento o la reducción de la absorción de infrarrojos.
- En última instancia, la técnica FTIR puede ser una herramienta rentable para la obtención de respuestas.

GRUPO FUNCIONAL	NUMERO DE ONDA (cm <sup>-1</sup> )	GRUPO FUNCIONAL	NUMERO DE ONDA (cm <sup>-1</sup> )
CH (estiramiento de alcanos)	2800 - 3000	Amidas	1690-1630
CH (estiramiento de alquenos)	3000 - 3100	-COCl	1815-1785
CH (estiramientos de alquinos)	3300 - 3400	Anhidridos	1850-1740 <sup>(2)</sup>
CH (flexión)	1350 - 1450	-C ≡ C-	2300-2100
CH (oscilación)	700 - 750	-C ≡ N	~ 2250
C-C (estiramiento)	1450 - 1610	-N=C=O	~ 2270
C-C (flexión)	400 - 700	-N=C=S	~ 2150
OH (enlace de hidrógeno)	3100-3200	C=C=C	~ 1950
OH (sin enlace de hidrógeno)	3600	NH	3500-3300
Cetonas	1725-1700	C=N-	1690-1480
Aldehídos	1740-1720	NO <sub>2</sub>	1650-1500 1400-1250
Aldehídos y cetonas α,β-insaturados	1715-1660	S=O	1070-1010
Ciclopentanonas	1750-1740	sulfonas	1350-1300 1150-1100
Ciclobutanonas	1780-1760	Sulfonamidas y sulfonatos	1370-1300 1180-1140
Ácidos carboxílicos	1725-1700	C-F	1400-1000
Esteres	1750-1735	C-Cl	780-580
Esteres α,β-insaturados	1750-1715	C-Br	800-560
δ-Lactonas	1750-1735	C-I	600-500
γ-lactonas	1780-1760	CO (estiramiento)	1000 - 1260

**Tabla 2.** Posición en número de onda (cm<sup>-1</sup>) de vibraciones de grupos funcionales en Infrarrojo.

### 5.6.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

El estudio del efecto del calor sobre los materiales obviamente tiene una larga historia, desde los primeros intentos del hombre de producir cerámica, extraer metales (aproximadamente 8000 a.C.) y hacer vidrio (aproximadamente 3400 a.C.), pasando por las discusiones filosóficas de los alquimistas sobre los elementos del fuego y trabajos iniciales en el ensayo de minerales (1500 d.C.), pero no fue sino hasta finales del siglo XIX que los experimentos sobre el efecto del calor en los materiales se volvieron más controlados y más cuantitativos. En este mismo periodo se conceptualizaron términos como calor, temperatura y se desarrollaron las escalas de temperatura [40].

En resumen, muy breve, el calor es una de las formas en que se puede transferir energía. Dicha transferencia requiere una diferencia de temperatura y se han identificado tres mecanismos de transferencia: conducción, convección y radiación. Las leyes de la termodinámica se ocupan del equilibrio térmico (cero), la conservación de la energía (primero), la dirección de los procesos espontáneos, incluida la transferencia de calor (segundo), y el punto de referencia para las mediciones de entropía (tercero). Para proporcionar información cualitativa y cuantitativa útil sobre el efecto del calor en los materiales, los experimentos deben planificarse cuidadosamente y, a menudo, se utilizan equipos sofisticados. La siguiente definición formal de análisis térmico fue proporcionada originalmente por la Confederación Internacional de Análisis Térmico y Calorimetría (ICTAC):

“El análisis térmico se refiere a un grupo de técnicas en las que la propiedad de una muestra se controla contra el tiempo o la temperatura mientras se programa la temperatura de la muestra, en una atmósfera específica. El programa de temperatura puede involucrar calentamiento o enfriamiento a una tasa fija de cambio de temperatura, o mantener la temperatura constante, o cualquier secuencia de estos”.

Comúnmente al someter a un material a un proceso de calentamiento experimenta eventos térmicos dependiendo de su composición química y atmósfera con la cual interactuara. Cuando una sola sustancia sólida pura (A), se calienta en una atmósfera inerte, el aumento resultante en el movimiento molecular, atómico o iónico puede conducir a cambios en la estructura cristalina, sinterización, fusión o sublimación. Algunas sustancias pueden descomponerse formando nuevos fragmentos moleculares, algunos o todos los cuales pueden ser volátiles a las temperaturas alcanzadas. A medida que se calienta un sólido, aumentan las amplitudes de las vibraciones de los componentes de la red y, finalmente, se alcanzará una temperatura en la que se producirá uno (o más) de los siguientes cambios:

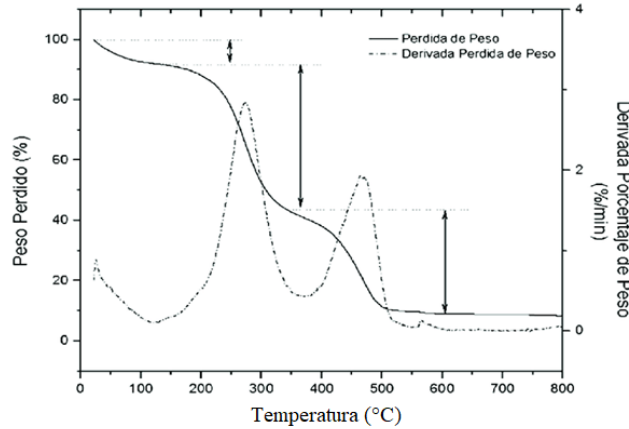


**Figura 17.** Descomposición térmica del carbonato de calcio.

- Transición de fase: una nueva disposición de los componentes puede volverse más estable que el original.
- Fusión: cuando hay suficiente energía disponible, las fuerzas de atracción entre los componentes se vuelven insuficientes para mantener la disposición ordenada del sólido y el sistema se relaja a la disposición más desordenada de los componentes en un líquido. Para algunas moléculas complejas, el cambio de sólido a líquido puede ocurrir en etapas. Las estructuras de orden intermedio se conocen como cristales líquidos.
- Sublimación: cuando la energía cinética de los constituyentes aumenta muy rápidamente, puede ocurrir una transición directa a la disposición desordenada de un gas, sin la formación intermedia de una fase líquida.
- Descomposición térmica: cuando las fuerzas de unión dentro de las moléculas constituyentes o los iones son más débiles que aquellos entre los átomos que constituyen estas unidades, el aumento de la temperatura puede dar lugar a la redistribución de enlaces y la formación de productos químicamente diferentes del reactivo. Dichos procesos químicos se denominan descomposición térmica (o cristólisis).

El análisis termogravimétrico o análisis gravimétrico térmico (TGA) es un método de análisis térmico en el cual la masa de una muestra se mide a lo largo del tiempo a medida que cambia la temperatura. Esta medición proporciona información sobre los fenómenos físicos, como las transiciones de fase, la absorción y la desorción; así como fenómenos químicos que incluyen reacciones químicas, descomposición térmica y reacciones de gases sólidos (por ejemplo, oxidación o reducción) [41].



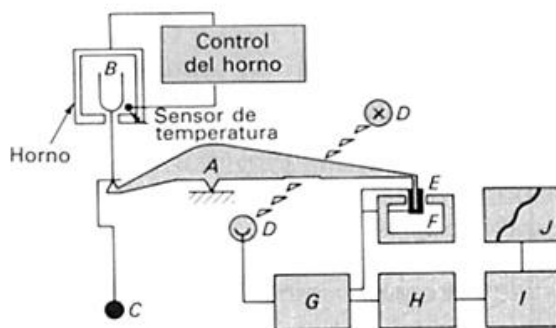


**Figura 18.** Termograma de un análisis termogravimétrico.

En un análisis termogravimétrico se registra, de manera continua, la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada, o bien en función de la temperatura, o bien en función del tiempo. En el primer caso (experimento dinámico) la temperatura de la muestra va aumentando de manera controlada (normalmente de forma lineal con el tiempo), y en el segundo (experimento isoterma), la temperatura se mantiene constante durante todo el experimento. La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo o de la temperatura se denomina termograma o curva de descomposición térmica. Los instrumentos comerciales para TGA consisten en:

- Una microbalanza sensible, llamada termobalanza.
- Un horno.
- Un sistema de gas de purga para proporcionar una atmósfera inerte o, a veces, reactiva.
- Un sistema informático para control de instrumentos, adquisición de datos y procesamiento de datos.

Varios diseños de termobalanza diferentes disponibles comercialmente son capaces de proporcionar información cuantitativa sobre muestras que varían en masa de menos de 1 mg a 100 g. Sin embargo, el rango habitual de termobalanzas es de 1 a 100 mg. Muchos de los balances pueden detectar cambios en la masa tan pequeños como 0.1  $\mu\text{g}$ . Aunque el soporte de la muestra debe estar alojado en el horno, el resto de la balanza debe aislarse térmicamente del horno.



a) brazo. b) copa (soporte). c) Contador de peso. d) Lámpara y fotodiodos. e) bobina.  
f) imán. g) control de amplificador. h) calculador de tara. i) amplificador. j) registro

**Figura 19.** Esquema de una termobalanza.



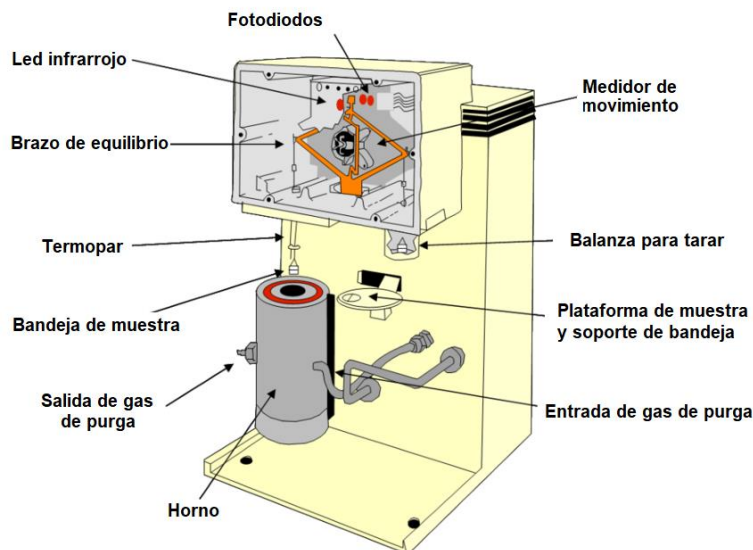
**Figura 20.** Horno de una termobalanza.

Los hornos para TGA generalmente cubren el rango de temperatura ambiente a 1000 °C, aunque algunos pueden usarse para temperaturas de hasta 1600 °C. Las velocidades de calentamiento a menudo se pueden seleccionar de 0.1 °C / min a 100 °C / min. Algunas unidades pueden calentar tan rápido como 200 °C / min. Se requiere aislamiento y enfriamiento del exterior del horno para evitar la transferencia de calor a la balanza. El nitrógeno o el argón se usan generalmente para purgar el horno y evitar la oxidación de la muestra. Para algunos análisis, es deseable cambiar los gases de purga a medida que avanza el análisis. La mayoría de los instrumentos TGA más nuevos utilizan controladores de flujo digitales para la supervisión del flujo de gas de purga.



**Figura 21.** Tipos de portamuestras (crisoles) para una TGA.

Las muestras están típicamente contenidas en bandejas de muestra hechas de platino, aluminio o una cerámica como la alúmina. El platino se usa con mayor frecuencia debido a su inercia y facilidad de limpieza. Los volúmenes de bandejas de muestra varían de 40  $\mu\text{L}$  a más de 500  $\mu\text{L}$ . Los recipientes de cerámica son mejores para muestras de gran volumen y baja densidad (por ejemplo, espumas) y para materiales que reaccionan con el platino. Las bandejas de aluminio son sustitutos económicos, pero no se pueden usar para temperaturas superiores a 600 ° C. Los muestreadores automáticos están disponibles como accesorios para la mayoría de los sistemas TGA. Con la mayoría de estas unidades, todos los aspectos se automatizan bajo control de software. La toma de muestras de tara, carga y medición de masa; el calentamiento y enfriamiento del horno; y la descarga de la sartén es totalmente automática. Para el control de temperatura y procesamiento de datos, los sistemas TGA modernos usan una rutina de control de temperatura computarizada que compara automáticamente la salida de voltaje del termopar con una tabla de voltaje versus temperatura almacenada en la memoria de la computadora. La computadora usa la diferencia entre la temperatura del termopar y la temperatura especificada para ajustar el voltaje al calentador. En algunos sistemas, el mismo termopar se comporta como el elemento de calentamiento y el sensor de temperatura. Con los sistemas de control modernos, es posible lograr un excelente acuerdo entre el programa de temperatura especificado y la temperatura de la muestra [38].



**Figura 22.** Esquema de un equipo TA Q500.

### 5.6.3. *Dispersión de luz dinámica (DLS)*

La dispersión dinámica de la luz (DLS), también conocida como espectroscopia de correlación de fotones, es un método eficiente utilizado para determinar el tamaño, la distribución del tamaño y la forma de las partículas en suspensión a través del movimiento browniano y el desplazamiento Doppler inducido por un rayo láser. Cuando una suspensión de partículas en movimiento browniano es excitada por un rayo láser monocromático, la longitud de onda de la luz entrante cambia después de golpear las partículas en movimiento, lo que crea un cambio Doppler, que es un pequeño cambio de frecuencia en la luz dispersa en comparación con la luz dispersa. Este cambio proporciona información sobre el tamaño, distribución, forma y estructura de las partículas. La luz dispersada por pequeñas partículas fluctúa rápidamente con un pequeño desplazamiento Doppler, mientras que a partir de partículas grandes se propaga lentamente mientras exhibe un gran desplazamiento Doppler. En general, debido a los cambios Doppler extremadamente pequeños, las energías del incidente y los fotones dispersos son casi idénticos, lo que resulta en una dispersión de luz casi estática. Como resultado, la técnica DLS se conoce a veces como una "técnica de dispersión de luz cuasielástica" [42].

La descripción del movimiento de la partícula y la distribución del tamaño de partícula en el medio se puede obtener utilizando la función de autocorrelación y midiendo el coeficiente de difusión de la partícula. La función de autocorrelación de la señal se determina utilizando una autocorrelación, que permite un análisis de las fluctuaciones dependientes del tiempo observadas en la intensidad de la luz dispersa. La tasa de disminución exponencial de la correlación de la señal,  $G$ , depende de la difusión de las partículas que se miden:

$$G = \int_0^{\infty} I(t)I(t + \tau)dt = B + Ae^{-2q^2D\tau} \quad (1)$$

Donde  $B$  es la línea de base,  $A$  es la amplitud y  $D$  es el coeficiente de difusión traslacional. El vector de dispersión ( $q$ ) está determinado por la siguiente ecuación:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2)$$

Donde  $n$  es el índice de refracción del solvente,  $\lambda_0$  es la longitud de onda de vacío del láser, y  $\theta$  es el ángulo de dispersión, generalmente 90 grados. La velocidad de este movimiento browniano se calcula y proporciona el coeficiente de difusión traslacional  $D$ . Este coeficiente de difusión se puede convertir en un diámetro hidrodinámico ( $D_H$ ) utilizando la siguiente ecuación de Stokes-Einstein, donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura y  $\eta$  es la viscosidad del dispersante:

$$D_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (3)$$

DLS tiene numerosas ventajas para medir el tamaño de las nanopartículas y se ha utilizado ampliamente para determinar el tamaño hidrodinámico de varias nanopartículas. El tiempo de medición para DLS es corto y está automatizado. Pequeñas nanopartículas como puntos cuánticos, grafeno, nanotubos de carbono y fullerenos. Desde aproximadamente 2010, y debido al creciente interés en la nanociencia y la nanotecnología, la técnica DLS no solo se ha utilizado en los laboratorios académicos, sino que también ha ingresado en los laboratorios

de diversas industrias, que incluyen aquellas que se ocupan de tierras raras, recubrimientos, materiales y ciencias de los alimentos, productos farmacéuticos y polvos fluorescentes.

La técnica DLS implica la medición de la ampliación Doppler de la luz dispersada por Rayleigh como resultado del movimiento browniano (difusión traslacional) de las partículas. Este movimiento térmico causa fluctuaciones de tiempo en la intensidad de dispersión y una ampliación de la línea de Rayleigh. La línea Rayleigh tiene una forma de línea lorentziana. En soluciones macromoleculares, las fluctuaciones de concentración suelen ser dominantes. En estas condiciones, el ancho de la línea de Rayleigh es directamente proporcional al coeficiente de difusión traslacional  $D_T$ . El método DLS utiliza técnicas de mezcla óptica y análisis de correlación para obtener estos coeficientes de difusión [38]. La muestra en un experimento DLS está bien dispersa en un medio suspendido. En un experimento típico de DLS, la muestra se ilumina mediante un rayo láser de longitud de onda única. Para medir los anchos Doppler, el instrumento DLS utiliza técnicas de mezcla óptica o de luz para traducir las frecuencias ópticas ( $\sim 6 \times 10^{14}$  Hz con la línea de 488 nm de un láser de  $\text{Ar}^+$ ) a frecuencias cercanas a 0 Hz (corriente directa) que se puede medir fácilmente. En la mayoría de los instrumentos DLS, se utiliza un tubo fotomultiplicador (PMT) como mezclador no lineal porque su salida es proporcional al cuadrado del campo eléctrico que cae sobre su superficie fotosensible. Para ver cómo el PMT actúa como un mezclador, supongamos que la radiación dispersa contiene ondas sinusoidales de dos frecuencias  $\omega_1$  y  $\omega_2$ . El vector de campo eléctrico  $E$  puede escribirse como:

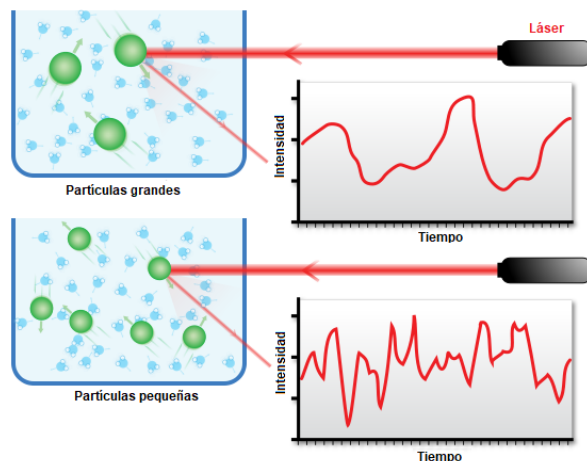
$$E = E_1 \sin \omega_1 t + E_2 \sin \omega_2 t \quad (4)$$

Donde  $E_1$  y  $E_2$  son las amplitudes de las dos ondas. La señal de salida PMT  $S(\omega)$  es proporcional al cuadrado del campo eléctrico y puede expresarse como:

$$S(\omega) = A \{ E_1^2 \sin^2 \omega_1 t + E_2^2 \sin^2 \omega_2 t + E_1 E_2 [\cos(\omega_2 - \omega_1) t - \cos(\omega_2 + \omega_1) t] \} \quad (5)$$

Donde A es una constante de proporcionalidad. El PMT no puede responder directamente a las frecuencias  $\omega_1$  y  $\omega_2$  o al término de suma porque estos son mayores de  $10^{14}$  Hz para la radiación visible. Sin embargo, el PMT puede responder al término de frecuencia de

diferencia ( $\omega_2 - \omega_1$ ), el llamado término de frecuencia de latido, que puede ser tan pequeño como unos pocos Hz. Cuando hay múltiples frecuencias presentes, se genera un espectro de diferencia centrado a 0 Hz. La dependencia del tiempo de las fluctuaciones de intensidad se utiliza para obtener la información del tamaño de partícula. Esto se logra mezclando (pulsación) la luz dispersada con una pequeña porción del haz de la fuente (detección heterodina) o pulsando la luz dispersada contra sí misma (autopulsación).

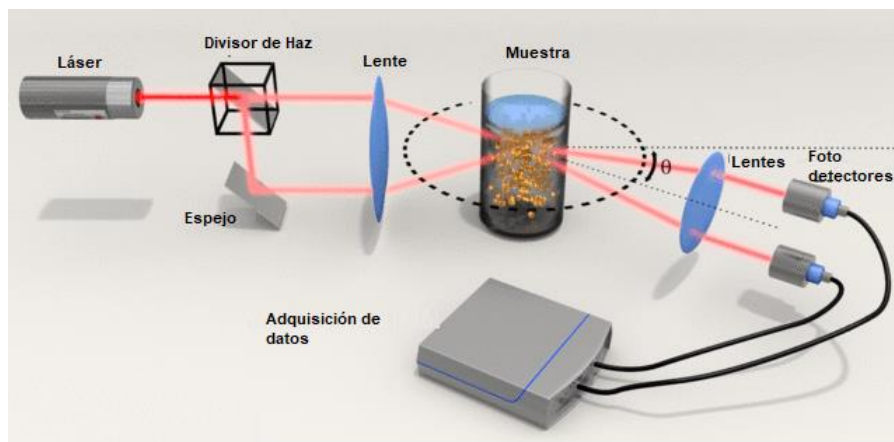


**Figura 23.** Fluctuaciones de intensidad a través del tiempo.

La señal de salida PMT es proporcional a la intensidad de radiación dispersa. Debido a que las partículas dispersas están en continuo movimiento térmico, la intensidad dispersa observada  $I(t)$  fluctúa con el tiempo. La traza de intensidad versus tiempo se asemeja a un patrón de ruido como se muestra en la *Figura 23*. Las partículas pequeñas hacen que la intensidad fluctúe más rápidamente que las partículas grandes. El siguiente paso en el proceso es determinar la función de autocorrelación de la señal (*Ecuación 1*). Con la autocorrelación, la señal se multiplica por una versión retrasada de sí misma y el producto tiene un promedio de tiempo. El producto promediado en el tiempo se obtiene en varios tiempos de retraso y se representa gráficamente en función del tiempo de retraso. La función de autocorrelación es la transformada de Fourier del espectro de potencia. Debido a que la radiación dispersa tiene una forma de línea lorentziana, su transformada de Fourier debería ser una desintegración exponencial. Según la teoría de DLS, la constante de tiempo de la disminución exponencial  $\tau$  está directamente relacionada con el coeficiente de difusión traslacional de las partículas esféricas isotrópicas en el movimiento browniano.

$$\tau = D_T q^2 \quad (6)$$

Donde  $q$  es la Ecuación 2 y el tamaño de partícula se obtiene del coeficiente de difusión traslacional  $D_T$  y la información de la forma de la partícula para una partícula esférica en relación con la ecuación Stokes-Einstein se usa para calcular el diámetro de la partícula hidrodinámica  $D_H$  (Ecuación 3). Para las partículas no esféricas, el diámetro hidrodinámico es el diámetro de una esfera hipotética que tendría el mismo coeficiente de difusión traslacional que la partícula no esférica. Es por eso, que la DLS también se puede usar para dar distribuciones de tamaño de partícula, aunque estas requieren una preparación cuidadosa de la muestra y tiempos de medición más largos. Los datos DLS no pueden proporcionar una distribución de tamaño de partícula totalmente precisa porque existen muchas distribuciones correspondientes a patrones de correlación similares.



**Figura 24.** Diagrama esquematizado de un analizador de partícula DLS.

Un instrumento DLS consta de una fuente láser, una celda de muestra, un fotodetector y una computadora con un autocorrelacionador. Una configuración instrumental típica para DLS se muestra en la *Figura 24*. Se utiliza un láser de longitud de onda continua que comúnmente son de He-Ne (632.8 nm) o  $\text{Ar}^+$  (488.0 nm y 514.5 nm), aunque para algunos equipos se usan diodos laser de 650 nm. El rayo láser se enfoca en el medio de la celda de muestra que contiene las partículas de interés suspendidas en un líquido. A menudo se usa una celda de muestra de tipo cubeta.



La celda generalmente está rodeada por un líquido mantenido a una temperatura constante. El índice de refracción de este líquido coincide con el del medio de suspensión. La muestra debe estar bien dispersada en el medio de suspensión. Esto generalmente se logra mediante agitación suave y, a veces, mediante agitación ultrasónica. Demasiada agitación puede causar la agregación de algunos materiales y la fractura de partículas en otros. Los solventes deben filtrarse cuidadosamente para evitar partículas de polvo y otros contaminantes que puedan causar dispersión. Debe haber una diferencia de índice de refracción entre el medio de suspensión y la fase dispersa, y debe conocerse el índice de refracción del disolvente. La viscosidad a la temperatura de medición también debe conocerse para poder aplicar la relación de Stokes-Einstein.



**Figura 25.** Tipos de celda de un analizador de partícula.

La concentración de la muestra a utilizar depende del tamaño de partícula, la potencia del láser y el índice de refracción de partículas. El límite superior de concentración está determinado por fenómenos de dispersión múltiple, donde la luz dispersada de una partícula es reescalada por otra. Las concentraciones máximas dependen del tamaño, pero para un dispersador fuerte, una concentración máxima de 0.01% es típica para partículas de 100 nm. El límite de concentración inferior está determinado por el número de partículas en el volumen de dispersión. Típicamente, se necesitan al menos 1000 partículas. Por lo general, se necesita algún ensayo y error para obtener la concentración adecuada. La luz durante el análisis se dispersa en un ángulo  $\theta$ , generalmente  $90^\circ$ , desde el haz incidente. La luz cuando se dispersa golpea la superficie del fotodetector actúa como un mezclador no lineal. La información del tamaño de partícula se obtiene luego de un análisis de correlación de la señal procesada como se discutió anteriormente.

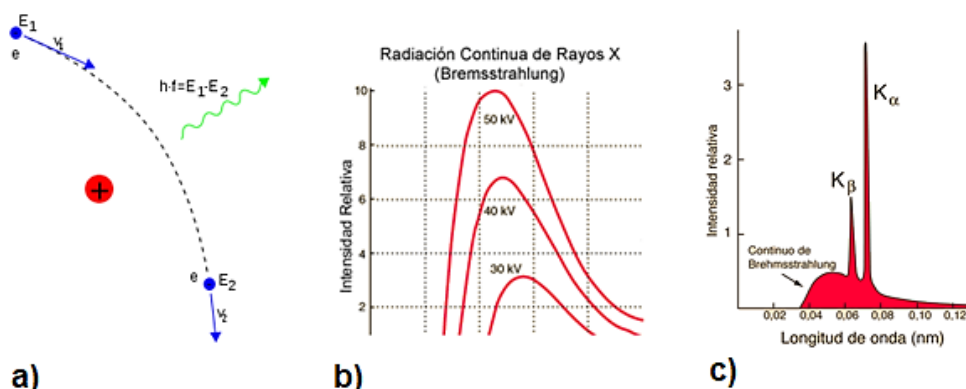
#### 5.6.4. Difracción de rayos X (XRD)

Los rayos X fueron descubiertos hace un siglo, en 1895, por el físico alemán W.C. Röntgen. Röntgen no patentó su descubrimiento, lo que facilitó el aprovechamiento de la desconocida radiación para infinidad de aplicaciones técnicas y científicas. A cambio recibió el premio Nobel en el año 1901. El fenómeno de difracción de los rayos X en un cristal fue descubierto mucho más tarde, en 1912, por Laue, Friedrich y Knipping. Este descubrimiento demostró de forma convincente la naturaleza ondulatoria de los rayos X, que pasarían a formar parte de la región de longitudes de onda más corta del espectro electromagnético. Además, la difracción de rayos X se convirtió en la primera y definitiva prueba experimental de la estructura periódica de los cristales [43]. Es bien conocido en óptica visible que la radiación con longitud de onda comparable o menor que la separación entre los elementos de una rejilla regular experimenta difracción. Por lo tanto, la longitud de onda de los rayos X debía ser del orden de las distancias entre los átomos. Estimulado por los resultados del experimento de Friedrich, Knipping y Laue se extendió la teoría de la difracción clásica al caso tridimensional, desarrollando lo que se conoce como teoría geométrica o cinemática de la difracción. La difracción sirvió como herramienta para estudiar la estructura atómica de los cristales, provocando el desarrollo de numerosas técnicas de caracterización de materiales.



**Figura 26.** Primera radiografía de Röntgen.

Hoy está claro que los rayos X son radiación electromagnética de exactamente la misma naturaleza que la luz, pero de una longitud de onda mucho más corta. La unidad de medida en la región de rayos X es el angstrom ( $\text{\AA}$ ), igual a  $10^{-10}$  m, y los rayos X usados en difracción tienen longitudes de onda que se encuentran aproximadamente en el rango de  $0.5\text{-}2.5 \text{\AA}$ , mientras que la longitud de onda de visible La luz es del orden de  $6000 \text{\AA}$ . Por lo tanto, los rayos X ocupan la región entre los rayos gamma y ultravioleta en el espectro electromagnético completo (Ver *Figura 13*). Los rayos x se generan cuando un haz de electrones muy energéticos (del orden de 1 keV) se desaceleran al chocar con un blanco metálico. Según la mecánica clásica, una carga acelerada emite radiación electromagnética, de este modo, el choque produce un espectro continuo de rayos X a partir de cierta longitud de onda mínima dependiente de la energía de los electrones. Este tipo de radiación se denomina *Bremsstrahlung*, o “radiación de frenado” (Ver *Figura 30a*). Además, los átomos del material metálico emiten también rayos X monocromáticos, lo que se conoce como línea de emisión característica del material.

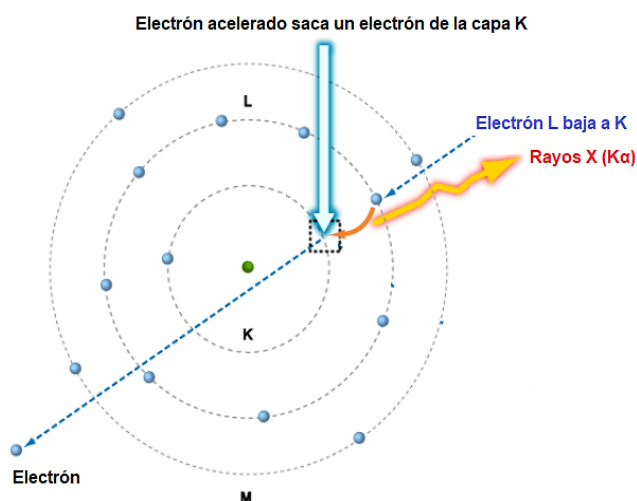


**Figura 27.** a) Radiación de frenado. b) Espectro continuo de Rayos X. c) Espectro característico de Rayos X.

Cuando se analizan los rayos provenientes del objetivo, se encuentra que consisten en una mezcla de diferentes longitudes de onda, y la variación de la intensidad con la longitud de onda depende del voltaje del tubo. La *Figura 30b* muestra el tipo de curvas obtenidas. La intensidad es cero hasta una cierta longitud de onda, llamada límite de longitud de onda corta ( $\lambda_{SWL}$ ), aumenta rápidamente a un máximo y luego disminuye, sin límite definido en el lado de longitud de onda larga. El espectro continuo resulta de la rápida desaceleración de los

electrones que golpean el objetivo ya que, como se mencionó anteriormente, cualquier carga desacelerada emite energía. Sin embargo, no todos los electrones desaceleran de la misma manera; algunos se detienen en un impacto y liberan toda su energía a la vez, mientras que otros se desvían de esta manera y por los átomos del objetivo, perdiendo sucesivamente fracciones de su energía cinética total hasta que se gasta todo.

Cuando el voltaje en un tubo de rayos X se eleva por encima de cierto valor crítico, la característica del metal objetivo, los máximos de intensidad aguda aparecen en ciertas longitudes de onda, superpuestas en el espectro continuo (Ver *Figura 30c*). Dado que son tan estrechos y que sus longitudes de onda son características del metal objetivo utilizado, se les llama líneas características. Estas líneas se dividen en varios conjuntos, denominados K, L, M, etc., en el orden de longitud de onda creciente, y todas las líneas forman el espectro característico del metal utilizado como objetivo. Para un objetivo de molibdeno, las líneas K tienen longitudes de onda de aproximadamente  $0,7 \text{ \AA}$ , las líneas L de aproximadamente  $5 \text{ \AA}$  y las líneas M aún más largas. Normalmente, solo las líneas K son útiles en la difracción de rayos X, ya que las líneas de longitud de onda más largas se absorben con demasiada facilidad. Hay varias líneas en el conjunto K, pero solo las tres más fuertes se observan en el trabajo de difracción normal.



**Figura 28.** Esquema de una transición electrónica en un átomo.

Para comprender este fenómeno, es suficiente considerar que un átomo consiste en un núcleo central rodeado de electrones que se encuentran en varias capas (Ver *Figura 31*), donde la designación K, L, M, ... corresponde al número cuántico principal  $n = 1, 2, 3, \dots$ . Si uno de los electrones que bombardean el objetivo tiene suficiente energía cinética, puede sacar un electrón de la capa K, dejando al átomo en un estado excitado de alta energía. Uno de los electrones externos cae inmediatamente en la vacante en la capa K, emitiendo energía en el proceso, y el átomo se encuentra nuevamente en su estado de energía normal. La energía emitida está en forma de radiación de una longitud de onda definida y es, de hecho, la radiación K característica  $\alpha$ . Cuando los rayos X encuentran alguna forma de materia, se transmiten parcialmente y se absorben parcialmente. Al principio, Röntgen estableció que la disminución fraccional en la intensidad  $I$  de un haz de rayos X a medida que pasa a través de cualquier sustancia homogénea es proporcional a la distancia recorrida  $x$  [44]. En forma diferencial:

$$-\frac{dI}{I} = \mu dx \quad (7)$$

Donde la constante de proporcionalidad  $\mu$  se denomina coeficiente de absorción lineal y depende de la sustancia considerada, su densidad y la longitud de onda de los rayos X. Integración de la *Ecuación 7* da:

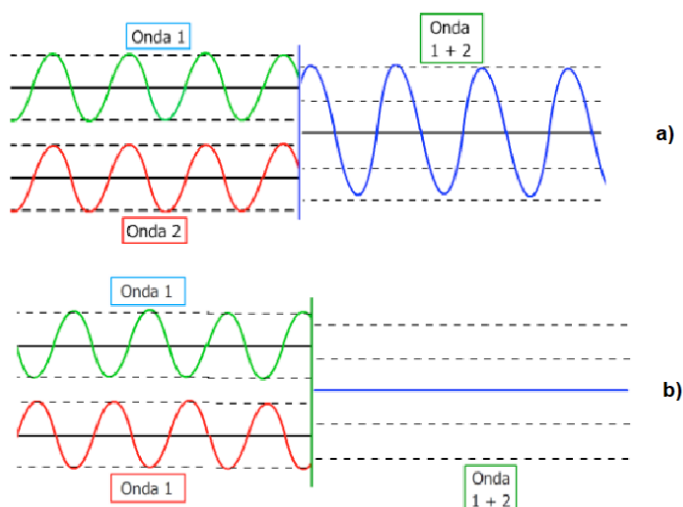
$$I_x = I_0 e^{-\mu x} \quad (8)$$

Donde  $I_0$  = intensidad del haz de rayos X incidente e  $I_x$  = intensidad del haz transmitido después de pasar a través de un espesor  $x$ . El coeficiente de absorción lineal  $\mu$  es proporcional a la densidad  $\rho$ , lo que significa que la cantidad  $\mu / \rho$  es una constante del material e independiente de su estado físico (sólido, líquido o gas). Esta última cantidad, llamada el coeficiente de absorción de masa es la que se suele tabular. La *Ecuación 8* puede ser reescrita en una forma más utilizable:

$$I_x = I_0 e^{\left(\frac{\mu}{\rho}\right)\rho x} \quad (9)$$

Los valores del coeficiente de absorción de masa  $\mu / \rho$  aparecen en el “Apéndice: Coeficientes de absorción de masa  $\mu / \rho$  (cm<sup>2</sup>/ gm) y las densidades  $\rho$ ” para varias longitudes de onda características comúnmente utilizadas en la difracción y en el Vol. C de las Tablas Internacionales para Cristalografía, para otras longitudes de onda [45].

Históricamente mucho del entendimiento que tenemos de los arreglos atómicos y moleculares en los sólidos han sido resultado de investigaciones mediante Rayos X. La difracción ocurre cuando una onda encuentra una serie de obstáculos espaciados regularmente, tal que son capaces de dispersar la onda y que los espacios son comparables en magnitud a la longitud de onda. Por otro lado, la difracción es consecuencia de las relaciones específicas de las fases que se establecen entre dos o más ondas que han sido dispersadas por obstáculos. Considerando las ondas 1 y 2, las cuales tienen la misma longitud de onda ( $\lambda$ ) y están sobre el mismo plano O-O’, y suponiendo que ambas ondas son dispersadas de tal manera que siguen diferentes trayectorias. La relación de fase entre las ondas dispersadas, dependen de la diferencia del patrón de longitud del camino recorrido.



**Figura 29.** Demostración de interferencia a) constructiva y b) destructiva.

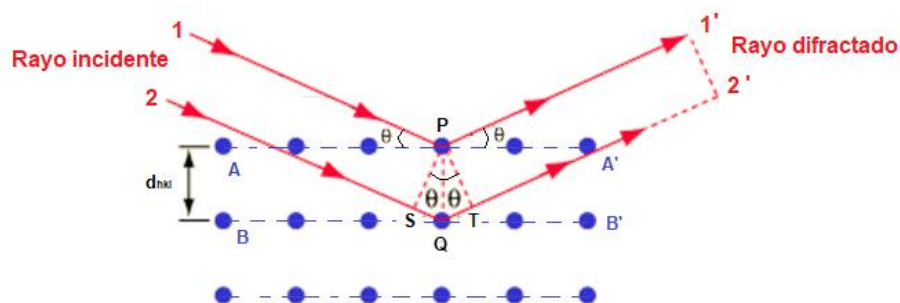
Una posibilidad es que esta diferencia de longitud del camino recorrido sea un número integral de longitudes de onda. Como se nota en la *Figura 32a*, estas ondas dispersadas (ahora denotadas 1' y 2') están en fase. Se dice que se refuerzan mutuamente (interferencia

constructiva) y, cuando las amplitudes son añadidas, la onda resultante se intensifica como se muestra en la parte derecha de la figura. Esta es una manifestación de difracción, y la referimos como un rayo difractado compuesto de un gran número de ondas dispersadas, que se refuerzan unas con otras. Otras relaciones de fase son posibles entre las ondas dispersadas que no resultan en un reforzamiento mutuo. La otra situación extrema se demuestra en la *Figura 32b*, donde la diferencia de las longitudes de los caminos recorridos después de la dispersión es un número integral de la mitad de la longitud de onda. Las ondas dispersadas están fuera de fase esto es, se cancelan las amplitudes correspondientes o se anulan una a la otra, interfieren destructivamente (p.ej. la onda resultante tiene una amplitud cero), como se indica en el lado derecho de la Figura. Es claro que una relación de fase intermedias entre estos dos casos extremos es posible, dando como resultado un reforzamiento parcial.

En 1914, los físicos británicos William Henry Bragg y su hijo William Lawrence Bragg demostraron que los Rayos X difractado por los cristales podían ser tratados como “reflexiones” desde planos atómicos de la estructura cristalina, dependiendo del ángulo de difracción para una longitud de onda dada. Los rayos X son un tipo de radiación electromagnética que tiene una alta energía y longitudes de onda muy cortas, las longitudes de onda son del orden de espacios atómicos de los sólidos como se mencionó anteriormente. Cuando un haz de Rayos X incide sobre un material sólido, una porción de este rayo se dispersará en todas las direcciones por los electrones asociados a cada átomo o ion que está dentro del camino del haz. Consideremos ahora las condiciones necesarias para la difracción de rayos-X por un arreglo periódico de átomos. Si se tienen dos planos de átomos A-A' y B-B', como se muestra en la siguiente *Figura 33*, que poseen los mismos índices de Miller  $h$ ,  $k$  y  $l$ , y están separados por la distancia interplanar  $d_{hkl}$ . Asumiendo que un haz de rayos-X de longitud de onda  $\lambda$ , paralelo, monocromático y coherente (en fase) incide en estos dos planos con un ángulo  $\theta$ , dos rayos de este haz (1 y 2), son dispersados por los átomos P y Q.

Ocurrirá una interferencia constructiva entre los rayos dispersados (1' y 2') a un ángulo  $\theta$  de los planos, si la diferencia de la longitud del camino recorrido entre 1-P-1' y 2-Q-2' (p.ej., SQ +QT) es igual a un número  $n$ , de longitudes de onda. Esta es la condición de difracción:

$$n\lambda = \overline{SQ} + \overline{QT} \quad (10)$$



**Figura 30.** Difracción de Rayos X por los planos de átomos A-A' y B-B'.

W. L. Bragg visualizó la difracción de rayos-X en término de reflexiones provenientes de los planos de un cristal, dando como resultado la simple relación (conocida como la Ley de Bragg):

$$n\lambda = 2 d_{hkl} \text{Sen } \theta \quad (11)$$

Para que una familia de planos cristalográficos difracte, la diferencia del camino recorrido por ondas dispersadas sea un múltiplo entero de la longitud de onda:

$$(\overline{SQ} + \overline{QT}) = n\lambda = (d_{hkl} \text{Sen } \theta + d_{hkl} \text{Sen } \theta) = 2 d_{hkl} \text{Sen } \theta \quad (12)$$

Cuando esta condición no se cumple, se obtiene interferencia destructiva. La difracción de Rayos X de cristales cúbicos está condicionada de la siguiente manera:

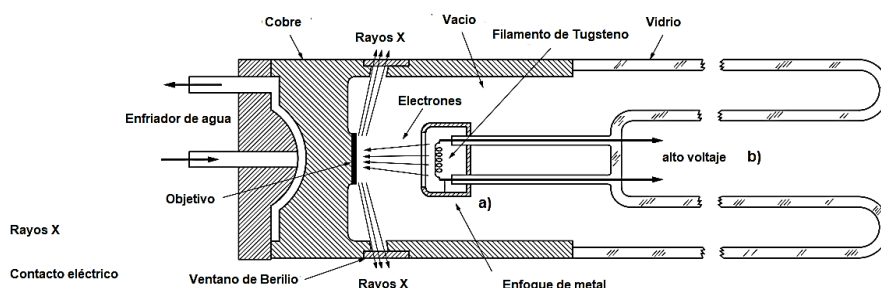
- cúbica P.- todos los planos difractan.
- cúbica F.- los índices  $hkl$  son todos pares o impares.
- cúbica I.- la suma de los índices  $hkl$  sea un número par.

Un difractómetro es un instrumento utilizado para medir la difracción de un haz de radiación sobre una muestra de un material. Los difractómetros se emplean para los experimentos de difracción de rayos X y difracción de neutrones. Los difractómetros modernos están controlados remotamente por ordenados y cuentan con elementos como:

- Tubo de rayos X
- Goniómetro
- Detector



Dado que los rayos X se producen cuando los electrones de alta velocidad chocan con un objetivo metálico, cualquier tubo de rayos X debe contener una fuente de electrones, un alto voltaje de aceleración y un objetivo metálico. Además, dado que la mayor parte de la energía cinética de los electrones se convierte en calor en el objetivo, este último casi siempre se enfría con agua para evitar su fusión.

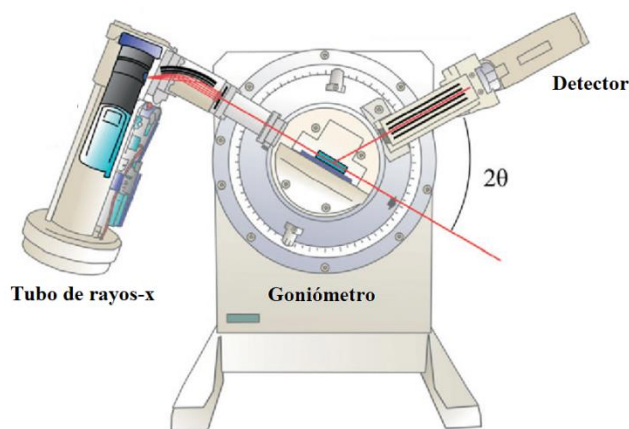


**Figura 31.** Esquema transversal de un tubo de Rayos X.

Todos los tubos de rayos X contienen dos electrodos, un ánodo (el objetivo de metal) mantenido, con pocas excepciones, en el potencial de tierra, y un cátodo, mantenido a un potencial negativo alto, normalmente del orden de 30,000 a 50,000 voltios para difracción trabajo. Los tubos de rayos X se pueden dividir en dos tipos básicos, según la forma en que se proporcionan los electrones: tubos de gas, en los que los electrones se producen por la ionización de una pequeña cantidad de gas y tubos de filamento, en los que la fuente de electrones es un filamento caliente.

La función del goniómetro y las etapas de posicionamiento de la muestra es establecer y controlar la relación geométrica entre el haz incidente, la muestra y el detector. El goniómetro es también la base de soporte para muchos componentes, como las fuentes de rayos X, la óptica de rayos X, las etapas del entorno de la muestra y los microscopios de alineación de muestras. El goniómetro utilizado para la difracción bidimensional es fundamentalmente el mismo que para un difractor convencional. En un sistema XRD, se necesitan al menos tres ejes de rotación para cubrir todas las orientaciones posibles de una muestra en el difractor. Estos tres ángulos de rotación pueden lograrse mediante una geometría euleriana, una geometría kappa ( $\kappa$ ) u otras geometrías.

Los tres ángulos en la geometría euleriana son  $\omega$  (omega),  $\psi$  (psi) y  $\phi$  (phi). Un difractómetro típico de cuatro círculos con geometría euleriana o geometría kappa incluye un eje para el ángulo de oscilación del detector  $\alpha$  además de los tres ejes de rotación de muestra. El difractómetro puede incluir tres ejes de traslación (X, Y, Z) para el posicionamiento de la muestra. Existen muchas variaciones de la geometría del goniómetro por razones históricas y preferencias para diversas aplicaciones. No todos los difractómetros tienen los seis ejes completos. El rango de cada eje también puede estar limitado debido a los requisitos de aplicación y las limitaciones mecánicas. Eso significa que los ángulos de rotación o las coordenadas de algunos ejes deben asignarse como constantes o cero [46].



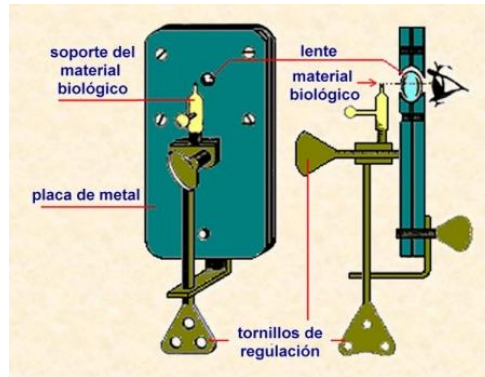
**Figura 32.** Esquema interno de un difractómetro de XRD.

Los dispositivos usados para la detección de los rayos difractados pueden bien medir estos uno a uno o interceptar una parte amplia del patrón de difracción sobre una superficie. Entre los detectores del último tipo, el más usado durante mucho tiempo fue la película fotográfica, actualmente reemplazada por otros detectores más sensibles a los rayos X. Otro detector clásico del primer tipo es el contador proporcional unidimensional, normalmente un detector de centelleo, instalado en un difractómetro y controlado por ordenador. Este tipo de detector mide las reflexiones una a una y todavía se usa para la cristalografía de moléculas pequeñas, pero es poco eficaz en los experimentos con macromoléculas, donde el número de reflexiones ronda entre 10 000 y 100 000.

A partir de los años 1990 empezaron a aparecer nuevos detectores, como las placas de imagen (image plates). Las placas de imagen están recubiertas de un material fosforescente, donde los electrones incrementan su energía al absorber los rayos X difractados y son atrapados en este nivel en centros de color. Los electrones liberan la energía al iluminarse la placa con luz láser, emitiendo luz con intensidad proporcional a la de la reflexión. Estos detectores son un orden de magnitud más sensibles que la película fotográfica y poseen un margen dinámico superior en varios órdenes de magnitud, lo que facilita la medición simultánea de las reflexiones más intensas y las más débiles. Otros detectores usados en la actualidad son detectores electrónicos, conocidos como detectores «de área», que procesan la señal inmediatamente tras la detección de los rayos X. Pueden ser cámaras de ionización o una placa fosforescente acoplada a una cámara CCD.<sup>13</sup> En los años 2000 se empezaron a utilizar fotodiodos alineados formando una placa, denominados PAD (Pixel Array Detectors). Estos detectores se caracterizan por un gran margen dinámico y un tiempo muerto entre imágenes muy bajo, del orden de milisegundos [47].

#### ***5.6.5. Microscopia electrónica (SEM & TEM)***

Desde la antigüedad, siempre el ser humano ha sentido dentro de afán investigativo, que en la mayoría de los casos lo ha llevado descubrimiento de nuevos fenómenos y tecnologías y a alcanzar objetivo cada vez más ambiciosos. Entre científicos y estudiosos de la antigüedad existía la inquietud de observar partículas más y más pequeñas, sobre todo con la idea de llegar a la partícula ínfima que pudiera dar indicios sobre composición de la materia que formaba todas las seres y las cosas. Se tiene conocimiento, según Séneca, que los médicos griegos utilizaban bolas de cristal llenas de agua, para aprovechar el poder amplificador de las mismas y observar los tejidos enfermos. Los romanos conocían la capacidad de ciertos objetos cristalinos de amplificar las imágenes. En los libros del autor árabe Alhazen ben Alhazen, que datan siglo XI, se tiene ya referencias de lentes convexas; y las propiedades de las lentes biconvexas son descritas por Roger Bacon en el siglo XIII. En el siglo XVI, Georges Haefnagel publica el primer trabajo de estudios realizado sobre insectos, con la ayuda de lentes.

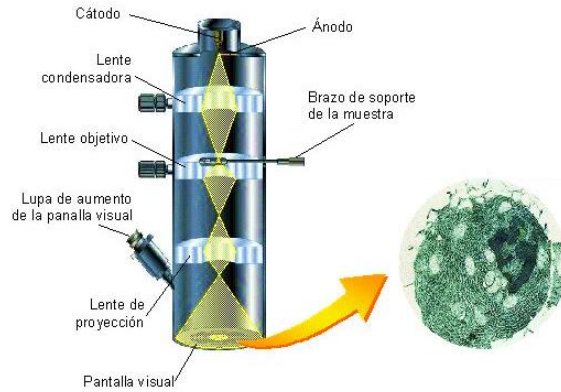


**Figura 33.** Microscopio de Antón van Leeuwenhoek.

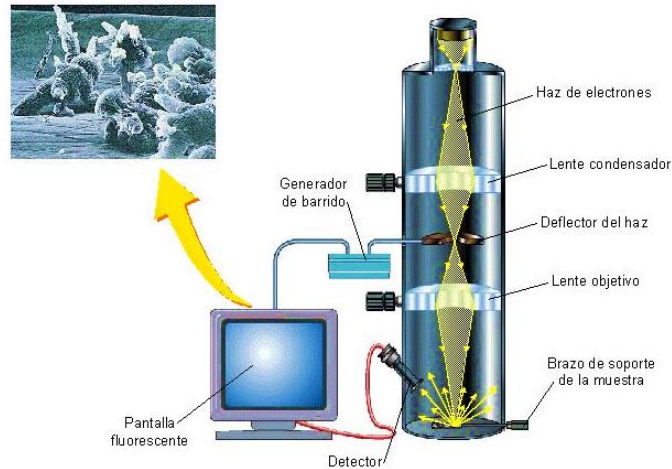
El primer instrumento para ver objetos muy pequeños fue inventado por el holandés Antón van Leeuwenhoek (1632 -1723), quien fue sin duda el verdadero impulsor de la microscopía. Su aparato, mostrado en la *Figura 33*, consistía en un sistema de poderosos lentes convexos y un porta-muestras ajustable. Las lentes eran fabricadas y pulidas por van Leeuwenhoek y con las mismas pudo realizar observaciones que le valieron gran fama como anatomista y fisiólogo. Con este simple instrumento obtenía ampliaciones de hasta 500 veces el tamaño normal de la muestra (500X). Posteriormente fue introducido otro lente para amplificar la imagen producida por el primero y se añadió una fuente de luz y una mesa para sostener y colocar la muestra en la posición adecuada. Este se convirtió en base del actual microscopio de luz.

Alrededor del año 1920 se descubrió que los electrones, al ser acelerados en un ambiente al vacío, se comportaban como la luz normal. Su longitud de onda, por supuesto era mucho más pequeña y se pensó en la idea de utilizarlos como la fuente de luz de un nuevo tipo de microscopio. También se descubrió que los campos magnéticos tenían sobre los electrones el mismo efecto que los lentes de cristal tienen sobre la luz visible. Tomó alrededor de diez años más, poder hacer un uso eficiente de los electrones y poder dominar su comportamiento, y es así como en 1931, el Dr. Ernst Ruska, de la Universidad de Berlín, combinó todas estas características y construyó el primer microscopio electrónico conocido. Debido a que los electrones "atravesaban" o se "transmitían" a través del espécimen observado. El aparato fue bautizado como un Microscopio Electrónico de Transmisión o TEM (de sus siglas en inglés: Transmission Electron Microscope).

### Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)

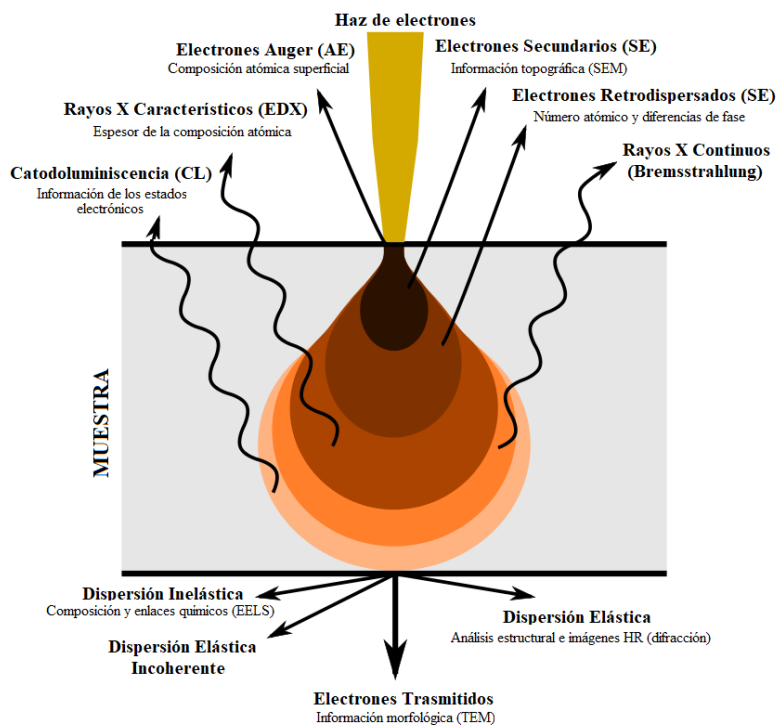


### Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)



**Figura 34.** Esquemas de microscopios electrónicos de transmisión y barrido.

Utilizando dos lentes electromagnéticas se logró obtener una ampliación de hasta 16 veces el tamaño original de la muestra. En 1935, el Dr. Ruska construyó un microscopio con tres lentes electromagnéticas y demostró que la resolución del mismo alcanzaba hasta los 100 nm, es decir dos veces mayor que la resolución del mejor de los microscopios de existentes hasta entonces. En la actualidad se utiliza hasta cinco lentes electromagnéticas para acelerar y guiar los electrones a través de la columna habiendo llegado a obtenerse un poder de resolución de 0,1 nm ampliación de hasta un millón de veces [48].



**Figura 35.** Señales producidas en la interacción electrón-muestra.

El haz de electrones es un tipo de “radiación ionizante”, término general dado a la radiación que es capaz de remover electrones de las capas internas del átomo. La radiación ionizante produce una amplia cantidad de señales secundarias al interactuar con la muestra, las cuales se muestran en la *Figura 35*. Muchas de estas señales son usadas en los microscopios electrónicos (ME) proporcionándonos información química y una gran cantidad de detalles del material. Para esto un microscopio electrónico emplea detectores externos como XEDS (X-Ray Energy Dispersive Spectrometry) y EELS (Electron Energy-Loss Spectrometry), etc. En contraste, con los microscopios que emplean radiación no-ionizante, como la luz visible, solo generan luz, por lo que, solo nos proporcionan imágenes. También cabe mencionar, que, para obtener buenas señales de la muestra, debemos generar un buen haz para que interactúe con la muestra, Así el origen de los electrones es crítico. Así los modernos microscopios electrónicos son instrumentos que generan un haz de electrones muy fino, con un diámetro <10 nm y los mejores con un diámetro <1 nm (98) para poder producir así las mejores señales y para esto es indispensable un cañón de emisión de campo.

La dispersión de los electrones puede ser elástica o inelástica. En el caso de la dispersión elástica, los electrones interactúan con el potencial electrostático del núcleo atómico. Este potencial desvía los electrones incidentes sin ninguna pérdida de energía apreciable, por tanto, es posible con la detección de estos electrones obtener imágenes por contraste, imágenes de difracción de electrones e imágenes de alta resolución. Por otra parte, en el caso de la dispersión inelástica, los electrones pueden transferir energía a diferentes grados de libertad del átomo. Esta transferencia puede causar excitación ionización de los electrones, vibraciones en la red cristalina y la posibilidad de calentamiento de la muestra, obteniendo así imágenes por microscopía electrónica de transmisión barrido (STEM), imágenes por filtrado de energía (EFTEM) y espectroscopia por pérdida de energía de electrones (EELS).

Para aumentar la trayectoria libre media de la interacción de gas de electrones, se evacúa el microscopio electrónico estándar a bajas presiones, generalmente en el orden de  $10^{-4}$  Pa. La necesidad de esto es doble: primero, la diferencia de voltaje entre el cátodo y el suelo sin generar un arco, y en segundo lugar, para reducir la frecuencia de colisión de los electrones con los átomos de gas a niveles insignificantes: este efecto se caracteriza por la trayectoria libre media. Los componentes ME, como los soportes de muestras y los cartuchos de película, deben insertarse o reemplazarse de manera rutinaria, lo que requiere un sistema con la capacidad de reevacuar de forma regular. Como tales, los ME están equipados con múltiples sistemas de bombeo y escapes de aire y no están permanentemente sellados al vacío.

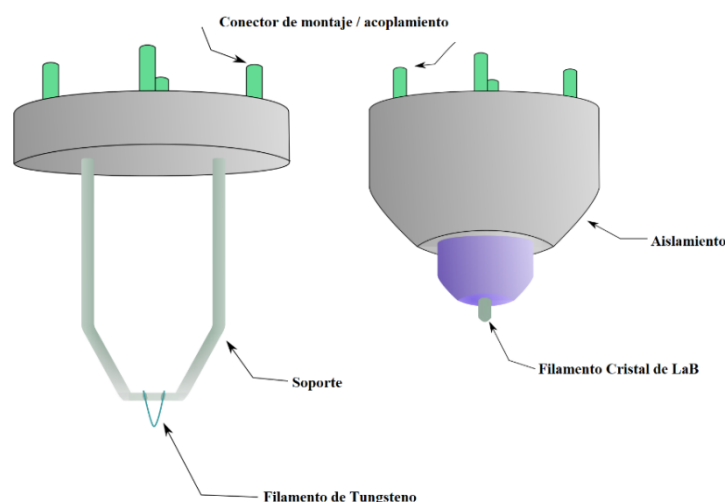


**Figura 36.** Niveles de vacío requeridos en el microscopio electrónico.



El sistema de vacío para evacuar un ME a un nivel de presión de operación consta de varias etapas. Inicialmente, se logra un vacío bajo o de desbaste con una bomba de paletas rotativas o con bombas de diafragma que establecen una presión suficientemente baja para permitir el funcionamiento de una bomba turbo-molecular o de difusión que establezca un alto nivel de vacío necesario para las operaciones. Para permitir que la bomba de bajo vacío no requiera un funcionamiento continuo, mientras opera continuamente las bombas turbo-moleculares, el lado de vacío de una bomba de baja presión puede conectarse a cámaras que alojan los gases de escape de la bomba turbo-molecular [49]. Las secciones de SEM y TEM se pueden aislar mediante el uso de aberturas limitadoras de presión para permitir diferentes niveles de vacío en áreas específicas, como un mayor vacío de  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  Pa o más en el cañón de electrones en alta resolución o emisión de campo.

Los TEM de alto voltaje requieren aspiradoras ultra altas en el rango de  $10^{-7}$  a  $10^{-9}$  Pa para evitar la generación de un arco eléctrico, particularmente en el cátodo TEM. Como tal, para un TEM de mayor voltaje, puede funcionar un tercer sistema de vacío, con la pistola aislada de la cámara principal, ya sea por válvulas de compuerta o por una apertura de bombeo diferencial, un pequeño orificio que impide la difusión de las moléculas de gas en el área de la pistola de mayor vacío más rápido que ellos. puede ser bombeado. Para estas presiones muy bajas, se utiliza una bomba de iones.



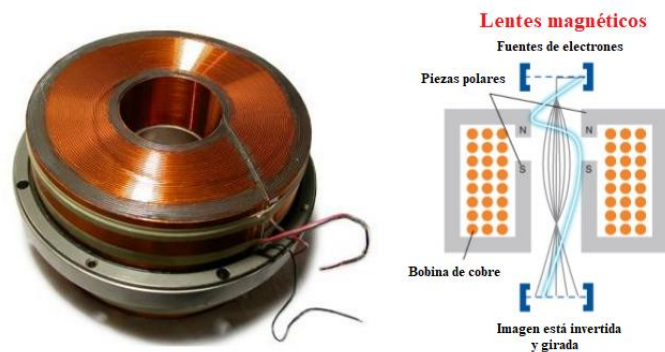
**Figura 37.** Tipos de Fuentes de electrones.



Desde arriba hacia abajo, el ME consiste en una fuente de emisión o cátodo, que puede ser un filamento o una aguja de tungsteno, o una fuente de cristal único de hexaboruro de lantano (LaB<sub>6</sub>). La fuente de electrones está conectada a una fuente de alto voltaje (típicamente ~ 100–300 kV) y, con una corriente suficiente, la fuente comenzará a emitir electrones, ya sea por termiónica o por emisión de electrones de campo al vacío. En el caso de una fuente termiónica, la fuente de electrones normalmente se monta en un cilindro Wehnelt para proporcionar un enfoque preliminar de los electrones emitidos en un haz mientras también estabiliza la corriente utilizando un circuito de retroalimentación pasiva. En su lugar, una fuente de emisión de campo utiliza electrodos electrostáticos llamados extractores, supresores y lentes de cañón, con diferentes voltajes en cada uno, para controlar la forma y la intensidad del campo eléctrico cerca de la punta afilada.

La combinación del cátodo y estos primeros elementos de lentes electrostáticas a menudo se denomina colectivamente "cañón de electrones". Después de que abandona el cañón, el haz suele ser acelerado por una serie de placas electrostáticas hasta que alcanza su voltaje final y entra en la siguiente parte del microscopio: el sistema de lentes condensadoras. Estas lentes superiores del TEM enfocan aún más el haz de electrones al tamaño y ubicación deseados en la muestra.

Las lentes electrónicas (magnéticas) son las que desvían las trayectorias del haz de electrones de manera análoga a una lente óptica que desvía un haz de luz. Los electrones producidos por el filamento emisor son focalizados por el campo magnético de la lente electrónica. El objetivo del sistema óptico electrónico es proyectar sobre la muestra un haz de dimensiones mínimas. Las lentes magnéticas, al igual que las lentes ópticas, presentan aberraciones. La aberración esférica proviene del hecho que los rayos no paraxiales, los que forman ángulos mayores con el eje óptico del sistema, son más desviados que los rayos que forman pequeños ángulos con dicho eje. La aberración cromática proviene de los distintos ángulos de desviación de electrones que no tiene la misma energía. Debido a estas aberraciones no todos los electrones provenientes de la fuente convergen exactamente sobre el mismo punto de la muestra.



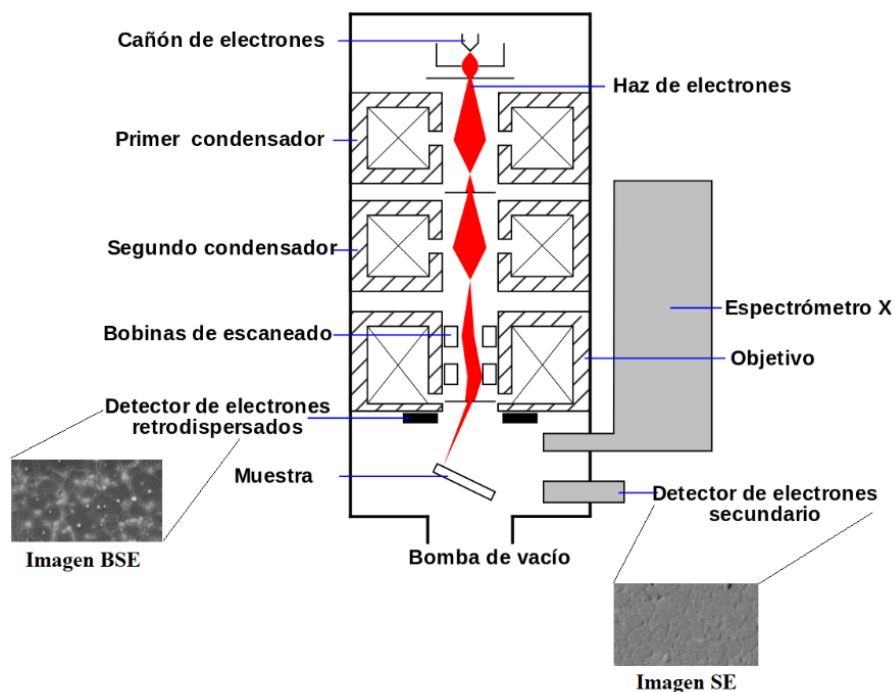
**Figura 38.** Esquema de lente electromagnético.

Las aperturas, que están centradas en el eje óptico del sistema, limitan la divergencia angular y definen el diámetro final del haz de electrones sobre la muestra. También limitan los haces que forman altos ángulos con el eje óptico reduciendo de esta manera el efecto adverso de la aberración esférica. Para cada valor de la corriente del haz existe un diámetro óptimo de las aperturas para minimizar los efectos de las aberraciones sobre el diámetro final del haz. A medida que el haz de electrones es focalizado por las distintas lentes, cada apertura elimina los electrones que se apartan del eje óptico mejorando el diámetro final del haz pero disminuyendo la intensidad del mismo. Es claro entonces que siempre existe un compromiso entre el tamaño final del haz sobre la muestra y la intensidad de la corriente electrónica. Aperturas más grandes y lentes menos potentes contribuyen a aumentar la intensidad de la corriente del haz, pero a expensas de un aumento del diámetro final proyectado sobre la muestra. Para obtener imágenes de alta resolución se necesita un haz de sección mínima sobre la muestra.

En la microscopía electrónica de barrido (SEM), el modo de imagen más común recolecta electrones secundarios (SE) de baja energía (<50 eV) que son expulsados de las bandas de conducción o de valencia de los átomos de la muestra por las interacciones de dispersión inelástica con los electrones de haz. Debido a su baja energía, estos electrones se originan dentro de unos pocos nanómetros debajo de la superficie de la muestra (Ver *Figura 35*). Los electrones son detectados por un detector Everhart-Thornley, que es un tipo de sistema colector-escintilador-fotomultiplicador. También es muy común recolectar en una

caracterización por SEM, los electrones retrodispersados (BSE), que consisten en electrones de alta energía que se originan en el haz de electrones, que se reflejan o se dispersan hacia atrás fuera del volumen de interacción de la muestra mediante interacciones elásticas de dispersión con los átomos de la muestra. Debido a que los elementos pesados (alto número atómico) producen electrones de retrodispersión con mayor fuerza que los ligeros (bajo número atómico) y, por lo tanto, aparecen más brillantes en la imagen, los BSE se usan para detectar el contraste entre áreas con diferentes composiciones químicas [50].

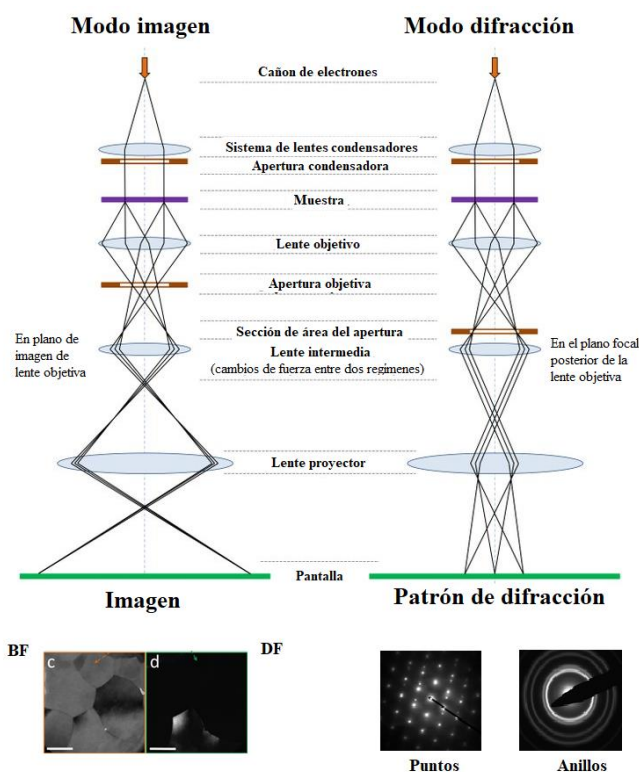
Para la microscopía electrónica de transmisión (TEM) existen dos tipos de imagen. La primera es modo de imagen, donde la apertura del objetivo se inserta en un plano focal posterior (BFP) de la lente del objetivo (donde se forman los puntos de difracción). Si se utiliza la apertura del objetivo, se selecciona el haz central (se bloquea la señal de reposo) y se obtiene la imagen de campo claro (imagen BF). Si permitimos la señal del haz difractado, se recibe la imagen de campo oscuro (imagen DF).



**Figura 39.** Esquema y modos de imagen en SEM.

Luego, la señal seleccionada se magnifica y se proyecta en una pantalla (o en una cámara) con la ayuda de lentes intermedias y de proyector. Se recibe imagen de la muestra (morfología). Mientras que la segunda es el modo difracción, la apertura del área seleccionada se utiliza para determinar el área del espécimen desde la cual se mostrará la señal. Al cambiar la fuerza de la lente intermedia, el patrón de difracción se proyecta en una pantalla. La difracción es una herramienta muy poderosa para realizar una reconstrucción celular y la determinación de la orientación del cristal.

Los portamuestras de microscopía electrónica de barrido (SEM) comúnmente son cilindros de cobre, aluminio, oro y/o plata (un metal conductor); a los cuales se les ponen ya sea una cinta de carbón y/o pintura para fijar la muestra sobre él. Si el material a estudiar es un elemento no conductor, se le hace un baño de oro (capa) para que sea conductor y facilite el estudio. Los portamuestras se suelen colocar en un tambor para introducirlos al microscopio.



**Figura 40.** Modos de imagen en TEM.

Para microscopía electrónica de transmisión (TEM) se usan rejillas de difracción, que generalmente son de cobre con una membrana de carbón que sirve como soporte para la muestra. La rejilla tiene un tamaño estándar de 3 mm de diámetro y se coloca en una varilla portaobjetos para sus análisis.



**Figura 41.** Kit para colocar una muestra en SEM (Cinta de carbón, pintura de grafito y portamuestras de aluminio).



**Figura 42.** Varilla portaobjetos y rejilla de difracción.

## VI. METODOLOGÍA

### 6.1. Metodología 1 (Nano Bio-hidroxiapatita)

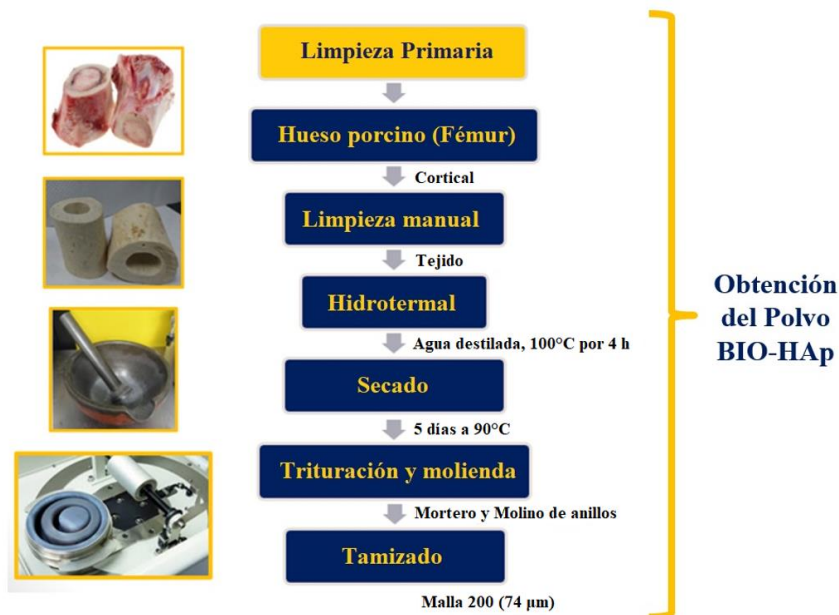


Figura 43. Etapa 1: Limpieza primaria (Obtención del polvo).

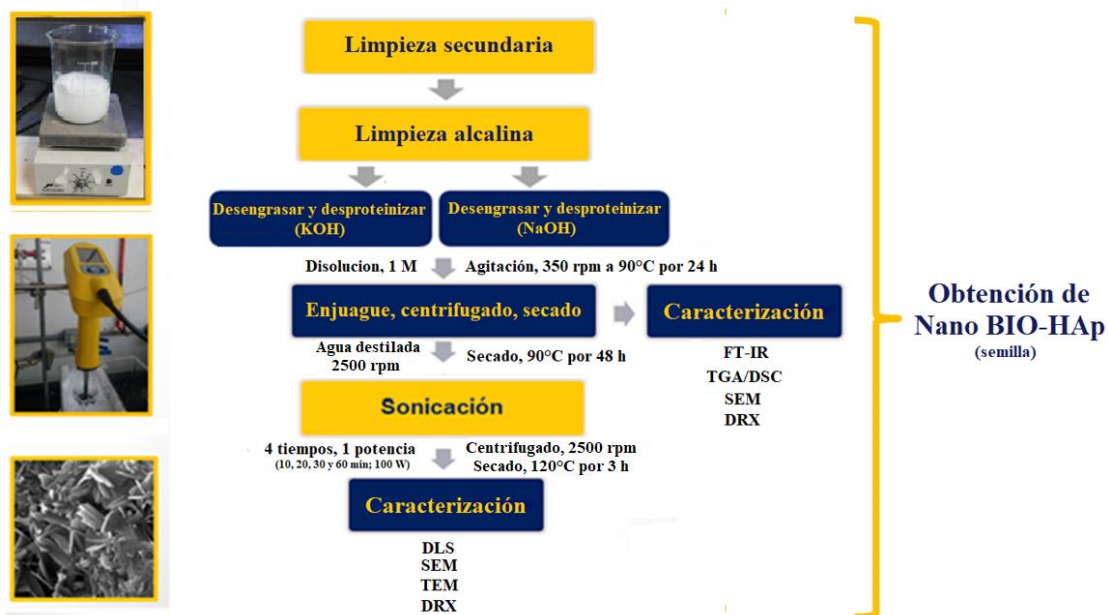


Figura 44. Etapa 2: Limpieza secundaria (limpieza alcalina) y Etapa 3: Sonoquímica. (obtención de nano BIO-HAP)

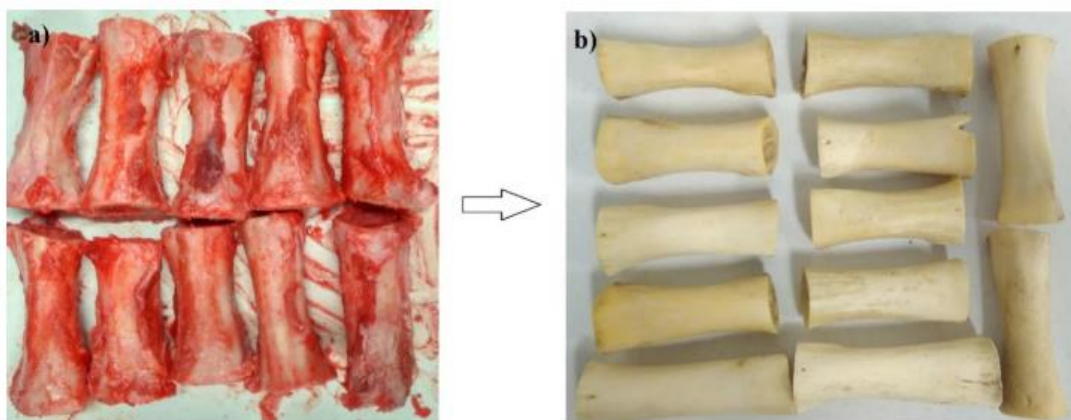


Para la obtención de polvo de hueso de porcino, se usó el pretratamiento de la metodología ya reportada por Ramírez-Gutiérrez et al. [10] esquematizado en el diagrama de bloque de la *Figura 42*. Primero, se adquirieron muestras de hueso de fémur (cortical) de porcino (6 meses de edad) recogido del matadero de Santa Rosa Jáuregui, Querétaro, Querétaro. Esta metodología consiste en un proceso de 3 etapas que se explican a continuación.

### **6.1.1. Obtención de polvo de Bio-hidroxiapatita**

#### **6.1.1.1. Limpieza primaria**

En la primera etapa se subdivide en 3 partes, donde primero se realizó una limpieza primaria al hueso de fémur de porcino adquirido, teniendo como objetivo conservar solo el hueso cortical o compacto. Se inició el proceso mediante la remoción manual (1era Subetapa) de toda la materia orgánica blanda (limpieza parcial) (*Figura 45a*). Para facilitar aún más esta limpieza se llevó a cabo una cocción por cuadruplicado en agua destilada durante una hora y se cambió de agua destilada por cada repetición (2da Subetapa). Una vez terminado la cocción se realizó una remoción completa de todo el tejido blando restante visible en el hueso. Por último, se dejó secar en un horno a una temperatura constante de 90° C por 5 días (*Figura 45b*) y después se llevó al proceso de molienda y tamizado.



**Figura 45.** Limpieza primaria: a) Hueso antes de la limpieza. b) Hueso después de la limpieza.

### 6.1.1.2. Trituración, molienda y tamizado

En la tercera subetapa, el hueso cortical de fémur de porcino ya seco se trituró a partículas menores a 5 mm con ayuda de un mortero de metálico para rocas (*Figura 46a*), posteriormente el hueso triturado fue llevado a un molino oscilatorio con anillos de carburo de tungsteno del laboratorio de molienda del Centro de Geociencias de la UNAM-Juriquilla, con capacidad de 40 a 80 gramos por carga, para moler el hueso durante tres minutos (*Figura 46b*). Finalmente, se obtuvo polvo de hueso que fue tamizado en una malla del número 200, tamaño de partículas menores a  $74\ \mu\text{m}$  (*Figura 46c*).



**Figura 46.** Obtención del polvo: a) Trituración. b) Molienda. c) Tamizado.

### 6.1.2. Limpieza secundaria

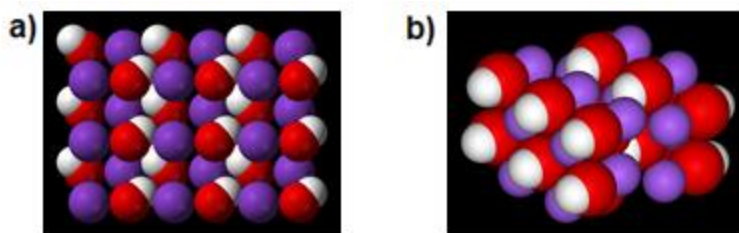
Luego de obtener el polvo de hueso cortical de porcino se procede a la segunda etapa que se divide en 2 subetapas.

#### 6.1.2.1. Limpieza alcalina

La primera subetapa de este apartado se continuó con la mezcla del polvo de hueso en disoluciones alcalinas para eliminar las grasas y proteínas (desengrasar y desproteinizar); el proceso se realizó en 2 tipos de sales básicas que tienen iones afines a las estructuras de la bio-hidroxiapatita:

- Hidróxido de potasio: KOH
- Hidróxido de sodio: NaOH

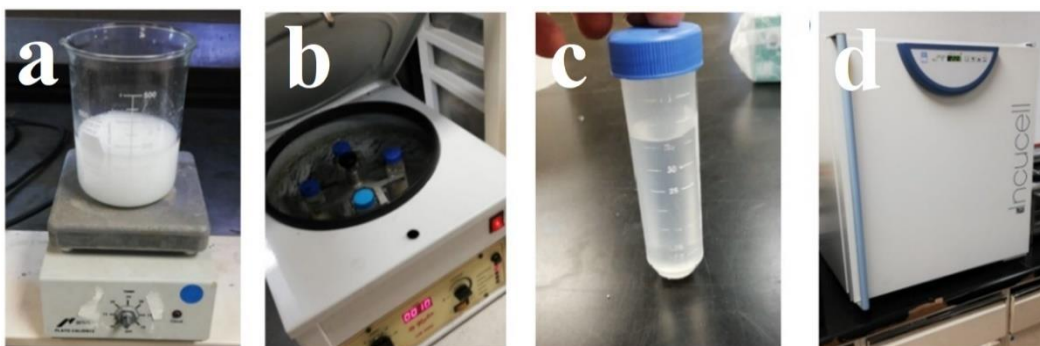




**Figura 47.** Celda unitaria: a) KOH y b) NaOH.

Se usaron 200 mililitros de agua destilada donde se agregaron 11.2211 gramos de KOH y en la otra disolución 7.9994 gramos de NaOH, obteniendo una molaridad de 1 M, para después agregar 40 gramos  $\pm$  5 gramos (que se pueden perder debido a los enjuagados y centrifugados) del polvo de hueso.

1. El primer paso consistió en tapar y dejar las disoluciones con el polvo en agitación constante por 24 horas a 350 rpm y 90 °C (*Figura 48a*).
2. Posteriormente, fue centrifugar a 2500 rpm por 15 minutos y enjuagar con agua destilada, haciendo este procedimiento 10 veces, para eliminar en lo mayor de lo posible la presencia del alcalino de limpieza (*Figura 48b & 48c*).
3. Y por último, se secaron las muestras en un horno a 90 °C por 48 horas (*Figura 48d*).



**Figura 48.** Limpieza alcalina: a) Agitación. b) Centrifugado. c) Enjuague. d) Secado.

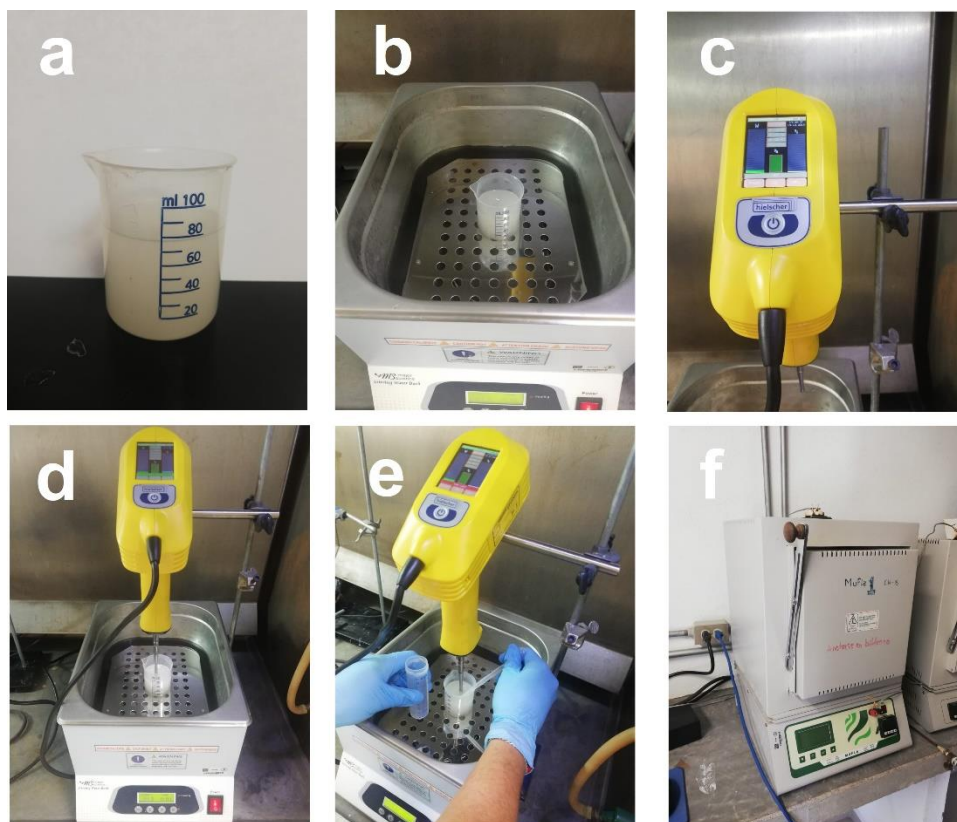
### 6.1.3. Sonicación



**Figura 49.** Homogeneizador ultrasónico portátil UP200Ht Hielscher.

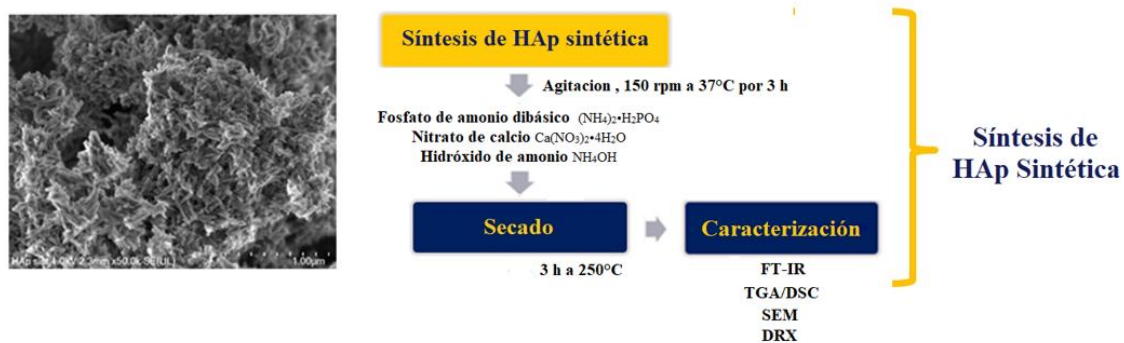
Para la sonoquímica se usó un homogeneizador ultrasónico modelo UP200HT de la marca Hielscher con un sonotrodo S26d7 fabricado de titanio y un diámetro de 7 mm. Las muestras se procesaron a una potencia nominal de 100 W y ha tiempos de 10, 20, 30 y 60 minutos. La metodología que se usó fue la siguiente:

1. En un vaso de precipitado se agregaron 80 mililitros de alcohol isopropílico y 1 gramo de polvo de hueso desengrasado y desproteinizado (*Figura 50a*). Y el vaso se colocó en un baño maría con agitación constante a 80 rpm a 0 °C (*Figura 50b*).
2. Luego se armó el sonicador en un soporte universal (*Figura 50c*).
3. Posteriormente, se empezó con la sonicación de 10 minutos (*Figura 50d*). Al terminar la sonicación se tomaron 15 mL de alícuota (*Figura 50e*) y se continuó con los 10 minutos siguientes (20 minutos totales), realizando el mismo procedimiento anterior a los 30 y 60 minutos totales.
4. Finalmente, se decantaron y centrifugaron las muestras (alcohol isopropílico y nano Bio-hidroxiapatita) para desechar el solvente y luego secar las muestras en una mufla a 120 °C por 3 horas (*Figura 50f*).



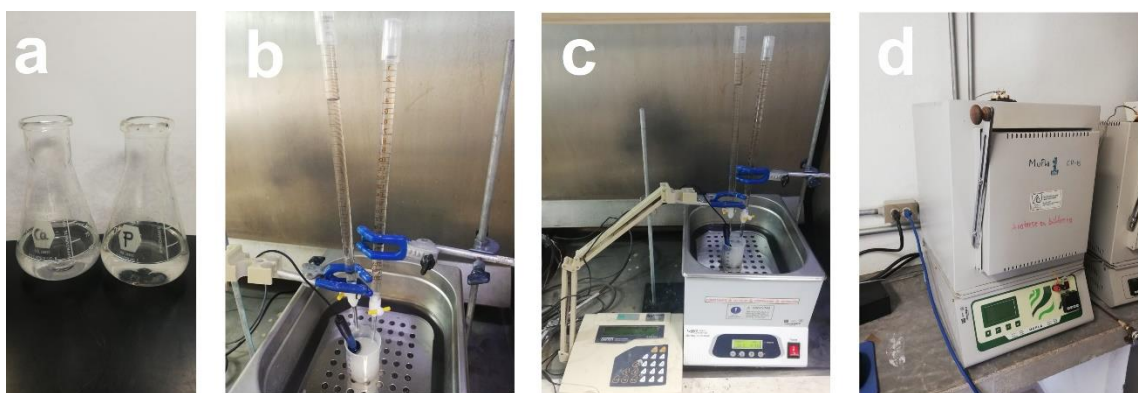
**Figura 50.** Obtención de nano BIO-HAP: **a)** Disolución. **b)** Baño maría frío. **c)** Ultrasonido. **d)** Sonicación. **e)** Muestreo. **f)** Secado.

## 6.2. Metodología 2 (Hidroxiapatita sintética)



**Figura 51.** Esquema de la síntesis de hidroxiapatita sintética.

En este trabajo se realizó la síntesis de hidroxiapatita sintética para tener un control con el cual comenzar con la investigación, por lo que se utilizaron las soluciones precursoras de fosfato de amonio dibásico  $[(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4]$  como donador del ion fosfato  $(\text{PO}_4)^{3-}$ , mientras que como promotores del ion  $\text{Ca}^{2+}$  se empleó una solución de nitrato de calcio tetrahidratado  $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O})$ . Las soluciones precursoras fueron preparadas en agua destilada en agitación constante y se usó hidróxido de amonio  $(\text{NH}_4\text{OH})$  para controlar el pH de 9 durante la síntesis. Para la elaboración de hidroxiapatita se llevaron a cabo los siguientes pasos:

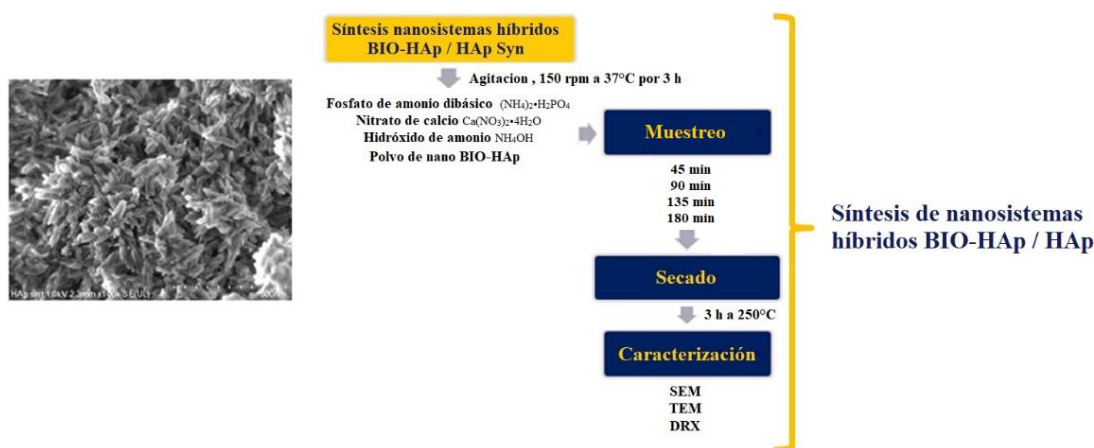


**Figura 52.** Síntesis de Hidroxiapatita: **a)** Precursores químicos. **b)** Vaso y buretas. **c)** Precipitación. **d)** Secado.

1. Se elaboraron las disoluciones que para el caso del fosfato  $[(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4]$  se preparó una solución al 0.6 molar en 50 mL, mientras que para el calcio  $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  se preparó una solución al 1 molar en 50 mL, con el fin de conservar la relación estequiométrica 1.67 respecto del calcio y el fósforo (*Figura 52a*).
2. Después, la solución de fosfato se coloca en un vaso de precipitado de plástico (25 mL) que se pone en un baño maría a 36 °C con agitación constante a 80 rpm, mientras que en las buretas se colocan 25 mL de la solución de calcio y 20 mL de hidróxido de amonio para regular el pH (*Figura 52b*).
3. Posteriormente, se comienza con el goteo de la solución de calcio mientras que se controla el pH: 9 con un potenciómetro in situ. Si el pH cambia se deja gotear hidróxido de amonio. Comúnmente en la reacción de Ca/P el pH sube a potenciales alcalinos (pH:14) (*Figura 52c*).

- Finalizado el goteo de la solución de calcio, se deja en agitación por 3 horas más. Finalmente se deja decantar y se centrifuga para desechar los compuestos que no reaccionaron y luego se seca la muestra en una mufla a 250 °C por 3 horas (*Figura 52d*).

### 6.3. Metodología 3 (Nanosistemas híbridos Nano BIO-HAp / HAp)



**Figura 53.** Esquema de la síntesis de nanosistemas híbridos (BIO-HAp/HAp).

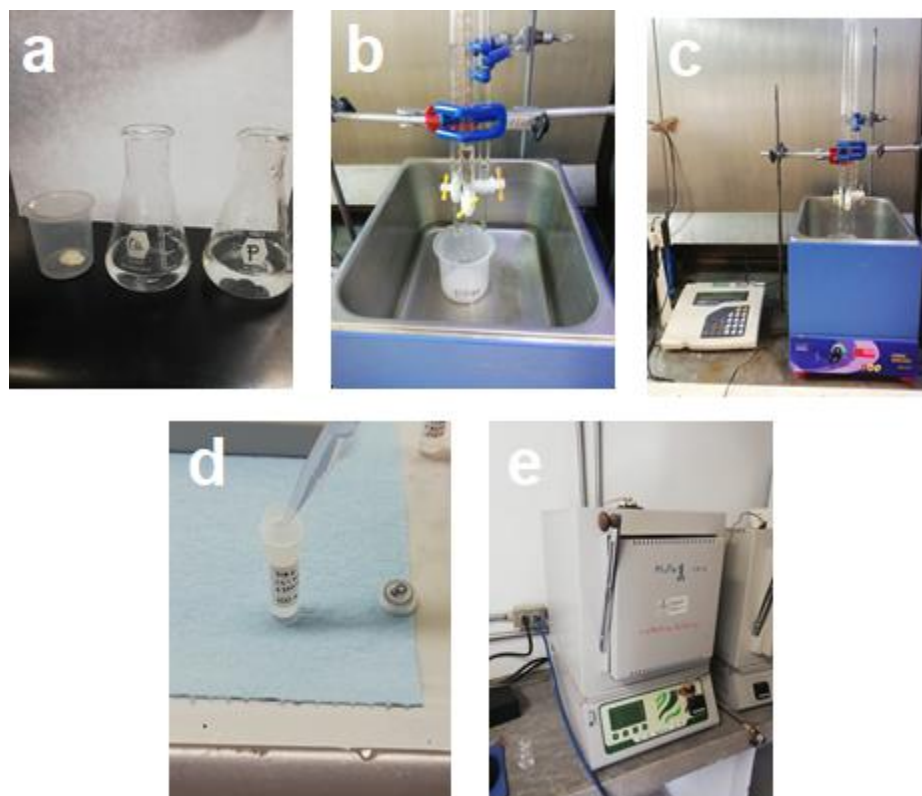
Para la síntesis de los nanosistemas híbridos (HNS) se realizaron casi los mismos pasos que el apartado anterior con la excepción que se agregaron las semillas (nanopartículas) de Bio-Hidroxiapatita. Se usó la siguiente metodología:

- Se elaboraron las disoluciones que para el caso del fosfato  $[(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4]$  se preparó una solución al 0.6 molar en 50 mL, mientras que para el Calcio  $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  se preparó una solución al 1 molar en 50 mL, con el fin de conservar la relación estequiométrica 1.67 respecto del calcio y el fósforo. (*Figura 54a*).
- Después, se colocaron 43.5 mg (P-KOH: PK10060) y 52.0 mg (P-NaOH: PN10060) en un vaso de precipitado de plástico respectivamente cada una y luego se colocaron en un baño maría a 36 °C con agitación constante a 80 rpm. Mientras que en cada una



de las 3 buretas se colocaron 25 mL de la solución de calcio, 25 mL de solución de fosfato y 20 mL de hidróxido de amonio para regular el pH (*Figura 54b*).

3. Posteriormente, se comienza con el goteo de la solución de calcio mientras que se controla el pH: 9 con un potenciómetro in situ. Si el pH cambia se deja gotear hidróxido de amonio. Comúnmente en la reacción de Ca/P el pH sube a potenciales alcalinos (pH:14) (*Figura 54c*).
4. Finalizado el goteo de las soluciones de calcio y fosfato, se deja en agitación por 3 horas, tomando alícuotas (2 mL) de la muestra cada 45 minutos después del comienzo de la agitación (*Figura 54d*). Cada muestra se deja decantar y se centrifuga para desechar los compuestos que no reaccionaron y luego se secan las muestras en una mufla a 250 °C por 3 horas (*Figura 54e*).



**Figura 54.** Síntesis de HNS (BIO-HAp/HAP): **a)** Precursores químicos y polvos. **b)** Vaso y buretas. **c)** Precipitación. **d)** Alícuotas. **e)** Secado.

## 6.4. Técnicas de caracterización

### 6.4.1. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

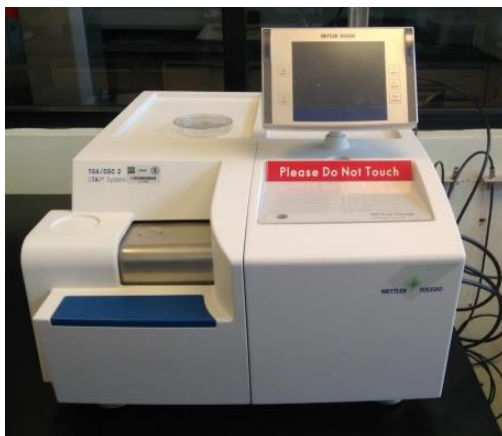
La identificación de los diferentes grupos funcionales de las muestras se realizó mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier en el equipo de IR marca PerkinElmer modelo Spectrum Two. Las muestras se analizaron en forma de polvo mediante reflexión total atenuada (ATR por sus siglas en inglés), con 32 repeticiones y en un rango de número de onda de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $600\text{ cm}^{-1}$  y resolución de  $2\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras analizadas fueron los Polvos: P-Raw, HAp Syn, P-KOH y P-NaOH.



**Figura 55.** Espectrofotómetro FTIR-ATR, PerkinElmer Spectrum Two.

### 6.4.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico se llevó a cabo en un equipo de la marca Mettler Toledo modelo TGA/DSC 2. Las muestras se analizaron en forma de polvo, las cuales se pesaron previamente en un rango entre 5 mg a 10 mg y se colocaron en crisoles de alúmina y fueron calentadas desde temperatura ambiente ( $25\text{ °C}$ ) hasta  $900\text{ °C}$  a  $5\text{ °C/min}$  en una atmósfera de oxígeno. Las muestras examinadas fueron los Polvos: P-Raw, HAp Syn, P-KOH y P-NaOH.



**Figura 56.** Balanza termogravimétrica, Mettler Toledo TGA/DSC 2 Star<sup>c</sup> System.

### ***6.4.3. Dispersión de luz dinámica (DLS)***

Para el análisis de tamaño de partícula se usó un analizador del tamaño de partícula de la marca Anton Paar modelo Litesizer 500. Las muestras se midieron en una disolución de alcohol isopropílico y nanopartículas de BIO-HAp que fueron dispersadas en un baño ultrasónico modelo BK-9050 de la marca Baku durante 5 minutos, y finalmente se colocaron 2 mL de muestra en una celda desechable otorgados por la compañía del analizador. Las muestras que se analizaron fueron las Nano BIO-HAp: PK10010, PK10020, PK10030, PK10060, PN10010, PN10020, PN10030 y PN10060. Los parámetros para la observación se ajustaron automáticamente por el software Kalliope, cambiando solamente:



**Figura 57.** Analizador de tamaño de partícula, Anton Paar Litesizer 500.



- Solvente: Isopropanol
  - Índice de refracción: 1.3772
  - Viscosidad: 2.4 mPa·s
- Material: Hidroxiapatita
  - Índice de refracción: 1.3772
  - Absorción: 0.1

#### 6.4.4. Difracción de rayos X (DRX)

Se usó la técnica de difracción de rayos X para determinar las fases cristalinas y los cambios en la calidad cristalina mediante el estudio de los cambios en la anchura a media altura (Full Width at Half Maximum; FWHM). Las muestras se colocaron densamente en un soporte de silicio modo zero background. Los patrones de difracción de rayos X se obtuvieron utilizando un difractómetro de la marca Rigaku modelo Ultima IV que funciona a 40 kV y 30 mA con una longitud de onda de radiación de  $\text{CuK}\alpha$  de  $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ . Los difractogramas se tomaron de 5 a 80 ° en una escala de  $2\theta$  y un tamaño de paso de 0.02 °. Las muestras estudiadas fueron:

- Polvos: P-Raw, HAp Syn, P-KOH, P-NaOH.
- Nano BIO-HAp: PK10010, PK10020, PK10030, PK10060, PN10010, PN10020, PN10030 y PN10060.
- Nanosistemas híbridos: HNSPK45, HNSPK90, HNSPK135, HNSPK180, HNSPN45, HNSPN90, HNSPN135 y HNSPN180.



**Figura 58.** Difractómetro de rayos X, Rigaku Ultima IV.

#### **6.4.5. Microscopia electrónica de barrido (SEM)**

Análisis morfológicos se llevaron a cabo en diferentes microscopios electrónicos. Las muestras: Polvos (P-Raw, P-KOH y P-NaOH) fueron analizadas en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6060 LV (Figura 59). Las mediciones se realizaron utilizando voltajes de aceleración de electrones de 10 y 20 kV. Antes del análisis, cada muestra se fijó en un portamuestras de cobre con cinta de carbono y se cubrió con una película fina de oro para que fueran conductivas antes de la prueba.



**Figura 59.** Microscopio electrónico de barrido, JEOL JSM-6060 LV.



**Figura 60.** Microscopio electrónico de barrido, JEOL JSM-7401 F.

Para las muestras Nano BIO-HAp (PK10010, PK10020, PK10030, PK10060, PN10010, PN10020, PN10030 y PN10060) y HNS (HNSPK45, HNSPK90, HNSPK135, HNSPK180, HNSPN45, HNSPN90, HNSPN135 y HNSPN180) se usó un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-7401 F (*Figura 60*), las muestras se obtuvieron empleando un voltaje de aceleración de 3 kV y 5 kV. Las muestras se colocaron en un pedazo de silicio cristalino y se montaron sobre el portamuestras del microscopio mediante una gota de pintura de plata, ya que íbamos a trabajar a bajo voltaje.

Por último, se utilizó un microscopio electrónico de barrido de alta resolución (HR-SEM) marca Hitachi modelo SUB230 (*Figura 61*) para caracterizar las muestras HAp Syn, NSHPK45, NSHPK180, NSHPN45 y NSHPN180, ya que eran de interés tener una mejor resolución de estos ejemplares. Las muestras se montaron sobre portamuestras de cobre y se le agregó una gota de pintura de grafito para sustentar los especímenes. El voltaje de aceleración usado para el análisis fue 1 kV y 3 kV.



**Figura 61.** Microscopio electrónico de barrido, Hitachi SUB230.

#### 6.4.6. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)



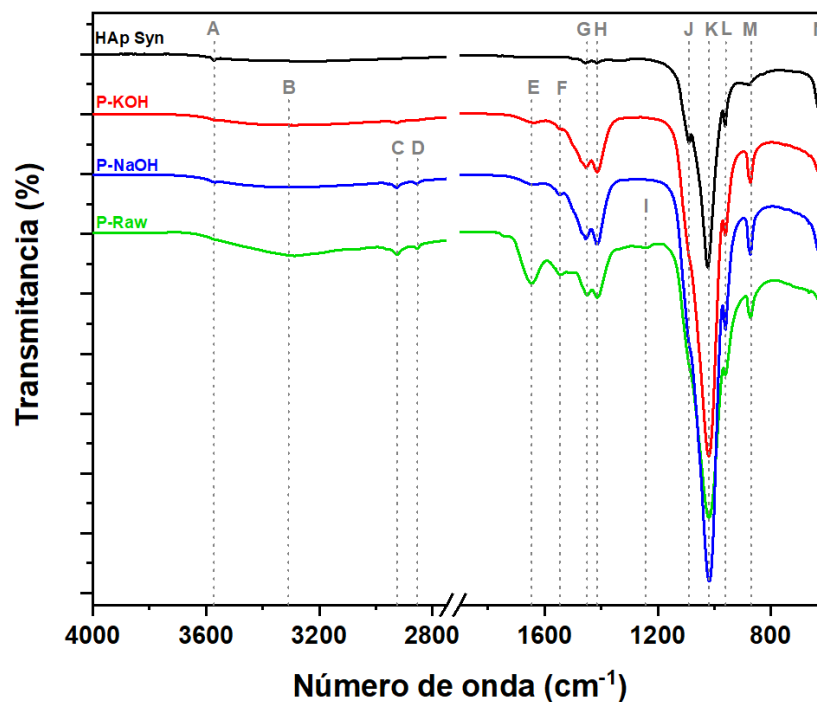
**Figura 62.** Microscopio electrónico de transmisión, JEOL JEM-2200 FS.

El análisis de TEM se realizó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo JEM-2200 FS (*Figura 61*). El estudio se realizó para las muestras P-Raw, HAp Syn, PK10060, PN10060, HNСПK45, HNСПK90, HNСПK135, HNСПK180, HNСПN45, HNСПN90, HNСПN135 y HNСПN180. Las muestras fueron tratadas previamente haciéndolas disolución con alcohol isopropílico y extraídas con un capilar para depositar una gota de muestra sobre una rejilla de cobre de 3 mm que se colocó en el portamuestras del TEM, para después llevarla a un limpiador de plasma para eliminar los orgánicos volátiles y finalmente colocarla en el microscopio para el análisis. El voltaje de aceleración empleado para el estudio fue 200 kV.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1.1. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

El análisis de Infrarrojo puede ser usado para indicar la eliminación de componentes orgánicos ya que puede detectar con facilidad grupos funcionales de estos compuestos, por lo que uso esta técnica para descubrir los cambios en las bandas características que se generaron con los procesos de limpieza.



**Figura 63.** Espectros de infrarrojo de HAp Syn, P-KOH, P-NaOH y P-Raw.

A continuación se muestran los espectros de infrarrojo de las muestras HAp Syn, P-KOH, P-NaOH y P-Raw en la que se pueden observar los diferentes modos vibracionales de los distintos enlaces presentes en las muestras. En la *Tabla 3* se pueden apreciar las bandas obtenidas en el análisis con su respectiva ubicación, identificación y referencia, que se puede encontrar en la literatura para nombrar el grupo funcional correspondiente de cada pico.

Grupo Funcional	Número de onda (cm <sup>-1</sup> ) *	Número de onda (cm <sup>-1</sup> ) <sup>R</sup>	Referencias
COOH v	(A) 3571 <sup>a b c</sup>	3570	[51]
O-H v	(B) 3360 <sup>b c d</sup>	3360 3367	[51] [52, 53]
C-H v	(C) 2925 <sup>c d</sup> (D) 2853 <sup>c d</sup>	2925, 2854 2923, 2850	[51] [53]
Amida I (C=O)	(E) 1645 <sup>b c d</sup>	1642 1670	[51, 54] [52]
Amida II	(F) 1545 <sup>b c d</sup>	1543	[51]
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> v <sub>3</sub>	(G) 1449 <sup>a b c d</sup>	1454, 1412	[51]
	(H) 1414 <sup>a b c d</sup>	1417	[52]
		1412, 1460	[53]
Amida II & III	(I) 1243 <sup>d</sup>	1430, 1457	[54]
	(J) 1090 <sup>a b c d</sup>	1240	[55]
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> v <sub>3</sub>	(K) 1020 <sup>a b c d</sup>	1088, 1014	[51]
		1043	[53]
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> v <sub>1</sub>	(L) 960 <sup>a b c d</sup>	960	[51, 53]
		962	[52]
		975	[56]
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> v <sub>2</sub>	(M) 873 <sup>a b c d</sup>	872	[51]
		871	[52]
		875	[54]
O-H v	(N) 631 <sup>a</sup>	630	[51, 55, 56]

\* Este trabajo: a.- HAp Syn. b.- P-KOH. c.- P-NaOH. d.- P-Raw. <sup>R</sup>: referencias.

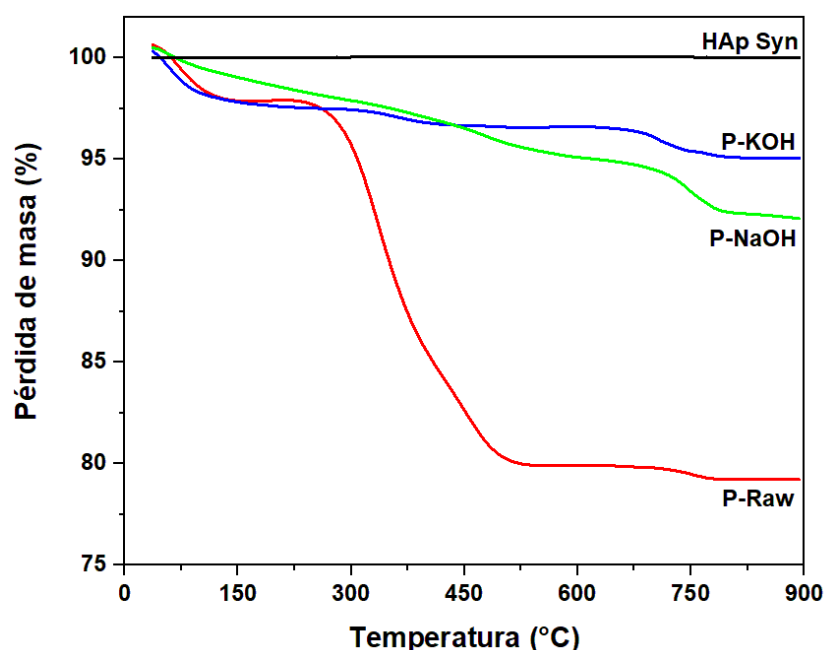
Modos vibracionales: v = tensión, δ = tijereteo, ρ = balanceo, τ = torsión, ω=aleteo.

**Tabla 3.** Posiciones de las bandas de infrarrojo en hidroxiapatitas.

La banda A corresponde a un grupo funcional carboxilo (COOH) perteneciente a las hidroxiapatitas debido a la interacción interna del ion carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) con iones hidroxilo (OH<sup>-</sup>) y protón de hidrogeno (H<sup>+</sup>), las muestras HAp Syn, P-KOH y P-NaOH presentan este pico debido son muestras puras o con un proceso de limpieza, ya que los grupos carboxilos fácilmente se enlazan con lípidos o proteínas. Mientras que la banda B está relacionada la presencia de agua (grupo hidroxilo: O-H) en la muestra, que puede adquirirse con la absorción de la humedad ambiental. Las bandas C y D corresponden a grupos alcanos (C-H) que se relacionan con lípidos derivadas del animal huésped (Porcino) y de las cuales con el tratamiento alcalino se deben disminuir (P-NaOH) o totalmente eliminadas (P-KOH). Otras bandas que debemos tratar eliminar son las proteínas relacionadas a grupos amida I (C=O), amida II y III que corresponden a la E y F, las cuales reducen su intensidad con el tratamiento alcalino de hidróxido de potasio e hidróxido de sodio.

Siguiendo con la identificación, podemos encontrar que el grupo carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) que está presente en la estructura de las hidroxiapatitas de origen animal como un ion sustituyente [6], se puede apreciar en las bandas G, H y M con mayor intensidad, a la vez que en la muestra HAp Syn se observar una menor intensidad ya que por la atmósfera durante la síntesis esta se carbonato. Los grupos fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) característicos de la hidroxiapatita se encuentran en las bandas J, K y L. Y finalmente, la banda N corresponde a un grupo hidroxilo (O-H) relacionado a la estructura química de la hidroxiapatita, en la cual queda mejor expuesto en la muestra HAp Syn debido que te no tiene contribuciones importantes de otros iones sustitucionales, grasas y/o proteínas como las muestras P-KOH, P-NaOH y P-Raw.

### 7.1.2. Análisis termogravimétrico (TGA)



**Figura 64.** Termogramas (TGA) de las muestras HAp Syn, P-KOH, P-NaOH y P-Raw.

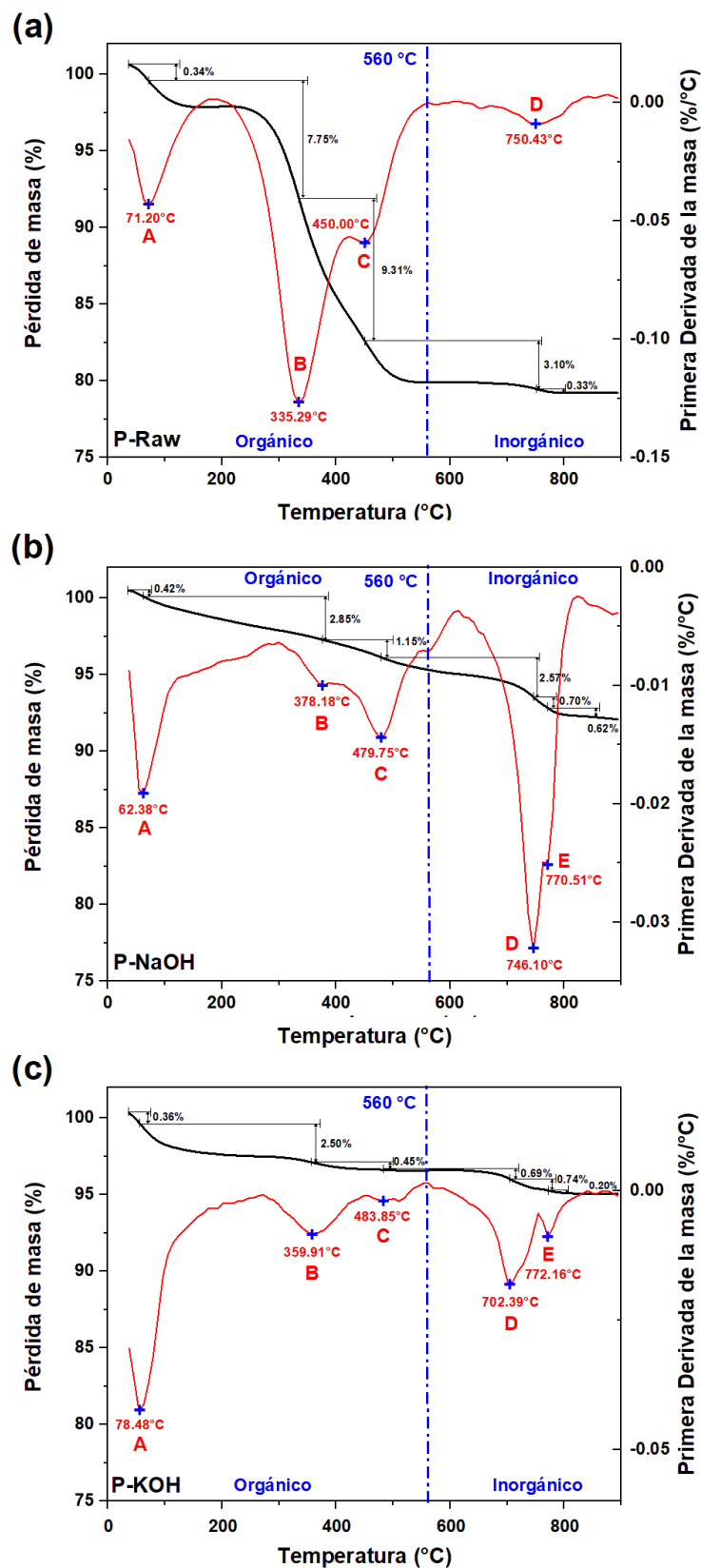
Una vez realizado el análisis por espectroscopía FT-IR, se complementó el estudio realizando un análisis termogravimétrico para observar el comportamiento térmico del polvo de hueso, los polvos con tratamiento alcalino y la muestra sintética. Una vez obtenidos los resultados se analizaron y se obtuvieron sus derivadas con el fin de determinar cuanta materia

perdía y a que temperatura ocurría, todo esto para comprobar si con las limpiezas alcalinas fueron idóneas para eliminar la materia orgánica y también observar eventos térmicos. En el termograma de la *Figura 64* se pueden contemplar todos los resultados de los análisis, teniendo como evidencia que la hidroxiapatita sintética (HAp Syn) es la única que se comportó de manera estable durante el estudio. No se apreció ninguna pérdida de peso importante, excepto, solo con una ligera disminución a partir de 750 °C debido al procesos ya sea de coalescencia en los cristales de hidroxiapatita o descomposición [9].

Sin embargo, para las demás muestras se encuentran eventos térmicos detallados en la *Figura 65*, donde se encontró en primeras instancias las pérdidas de masa por la presencia de agua (A) principalmente por la absorción de humedad de la muestra como también se observó en el análisis de infrarrojo (FT-IR), en temperaturas entre 62.38 °C a 78.48 °C. En tanto que, la segunda pérdida de masa observada (B) fue en temperaturas entre 335.29 °C y 378.18 °C y se debe a la degradación y combustión del colágeno, así como el principio de la degradación de los enlaces fosfolípidos (grasas). Consiguientemente, el evento térmico C es dado por la desnaturalización y degradación de las proteínas en temperaturas entre 450.00 °C y 483.85 °C. Como se puede observar hasta ese punto la muestra P-Raw durante los eventos B y C ya perdió un aproximado de 16 % en peso, lo que evidencia la gran contribución de la materia orgánica en el hueso (colágeno, proteínas y grasas), mientras que las limpiezas alcalinas solo fueron entre el 3 % al 4% lo que comprueba que eliminamos ese componente con el tratamiento.

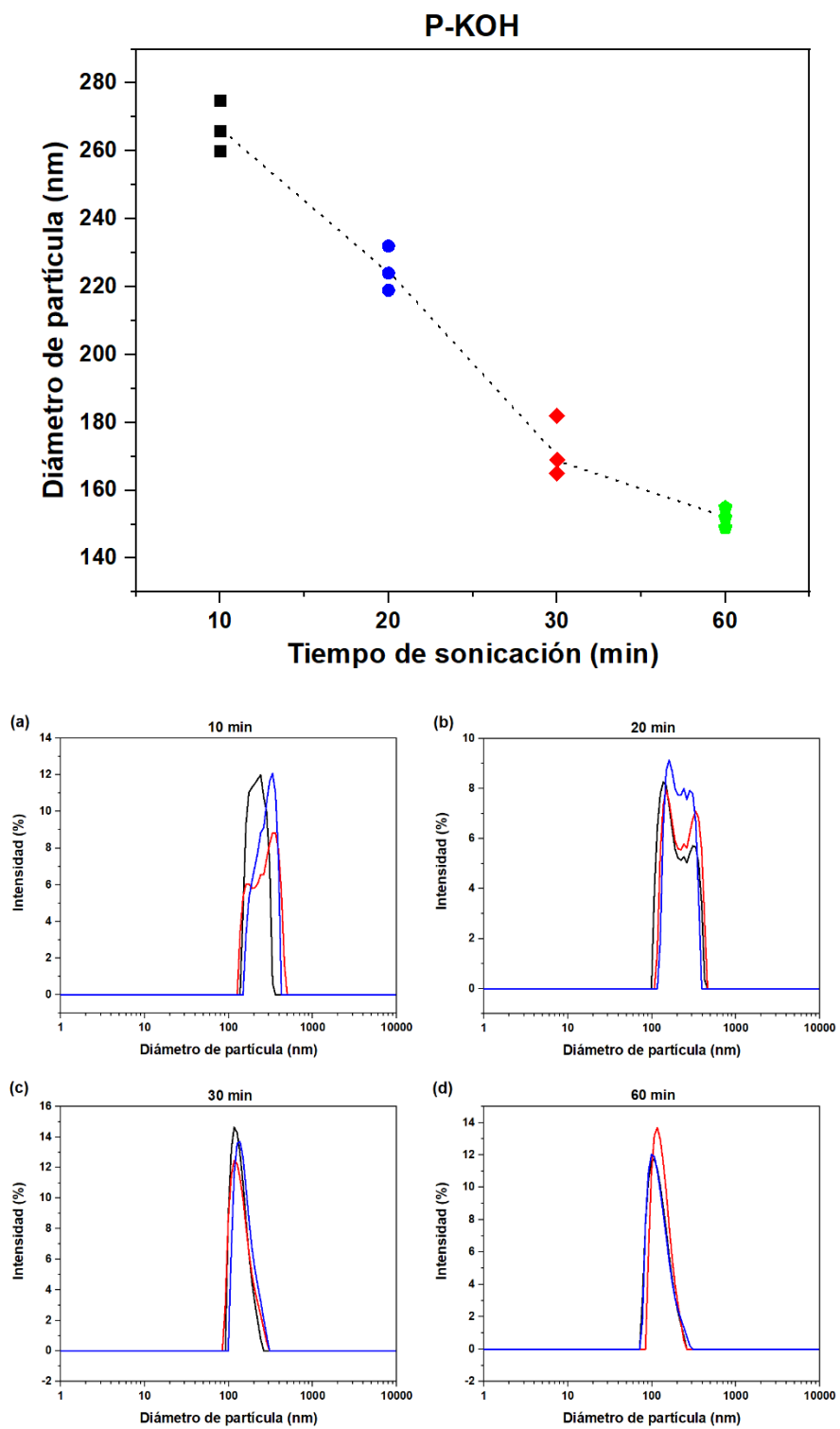
Y finalmente, llegamos a los eventos D y E que están entre 702.39 °C y 772.16 °C son atribuidos según algunos autores a procesos de coalescencia de cristales de hidroxiapatita [13], la descomposición de la hidroxiapatita hacia whitlockita:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , o la deshidroxilación de los grupos O-H en la estructura de la hidroxiapatita [9], a partir de temperaturas mayores a 700 °C.





**Figura 65.** Termogramas con la primera derivada: a) P-Raw. b) P-NaOH. c) P-KOH.

### 7.1.3. Dispersión de luz dinámica (DLS)



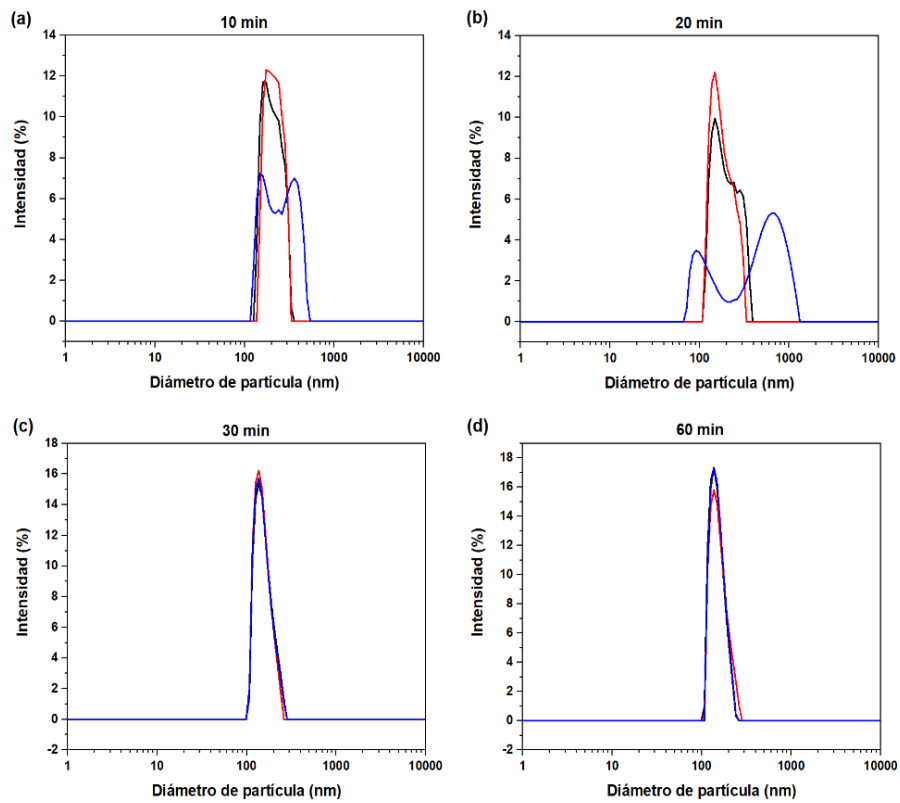
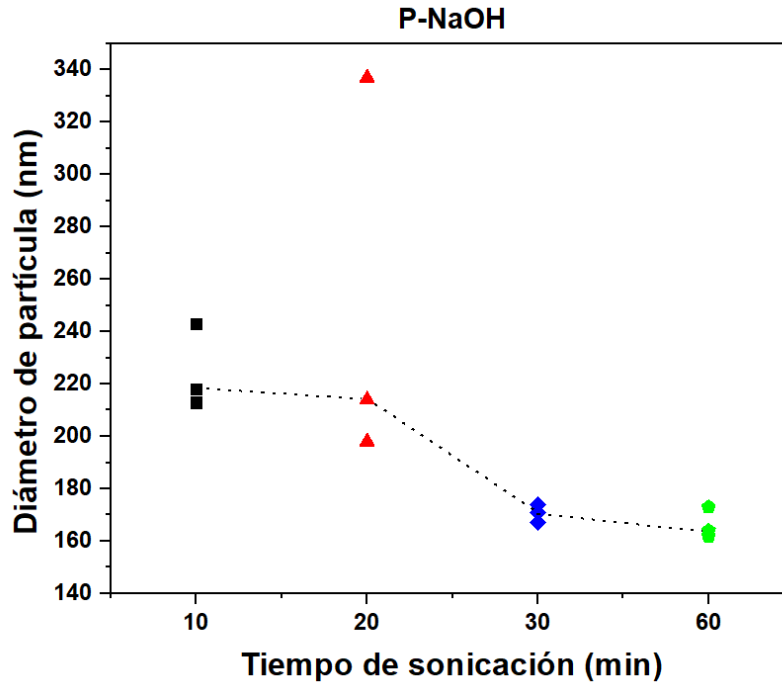
**Figura 66.** Diámetro de partícula P-KOH: a) PK10010. b) PK10020 c) PK10030. d) PK10060.

Una vez comprobada la eliminación de la materia orgánica a través del tratamiento alcalino, se sometieron los polvos P-KOH y P-NaOH a sonicación por 10, 20, 30 y 60 minutos de exposición y se analizaron por medio de dispersión dinámica de luz (DLS) para medir el tamaño de partícula.

Tanto en las muestras P-KOH y P-NaOH se pudo apreciar en las *Figuras 66 y 67* que ambas gráficas siguen una tendencia lineal decreciente mientras más tiempo de exposición tienen, menor es su tamaño de partícula. A los 10 minutos el tamaño promedio de ambas muestras oscila entre 275 nm y 210 nm, y a los 60 minutos el rango está entre los 160 nm. No obstante, estos valores son estimados debido a que no son una partícula total o parcialmente esférica por lo que algunas muestras (PK10010, PK10020, PN10010 y PN10020) en algunos puntos son multimodal como se puede observar en las *Figura 66 a-b y 67 a-b*, aunque la intensidad de distribución de tamaño se mantiene entre los rangos de valores. En cambio, al aumentar el tiempo de exposición (30 y 60 min) este patrón se convierte en un monomodal (*Figura 66 c-d y 67 c-d*) dando una distribución de tamaños hacia valores esféricos por lo que el radio hidrodinámico se vuelve ideal.

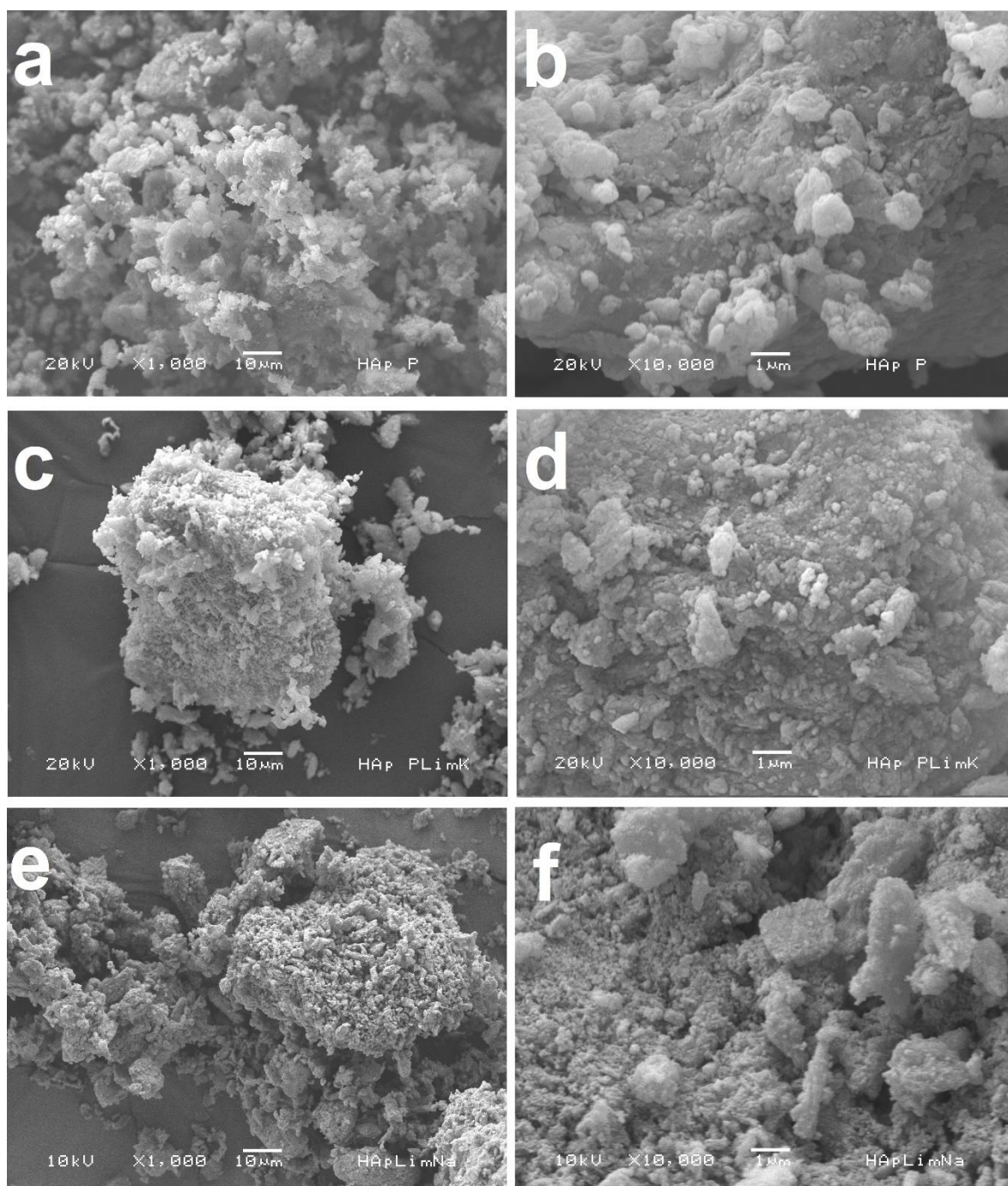
También se puede analizar que las gráficas de las *Figura 66 c-d y 67 c-d* exhiben que mientras más tiempo de sonicación, la polidispersidad es baja, debido a que los valores en diámetro (nm) describen una amplitud de la distribución gaussiana estrecha en una sola región. Con lo que podemos concluir que existen una gran variedad de tamaños en regiones acotadas que van desde los 280 nm hasta 150 nm mientras vamos aumentando el tiempo de exposición por lo que obtendremos semillas de nano BIO-HAp en rangos variables de  $\pm 35$  nm.

Una vez analizado e interpretado los análisis de DLS, se tomaron las muestras de 60 min (PK10060 y PN10060) como las semillas de crecimiento para los nanosistemas híbridos BIO-HAp / HAp en virtud de que cuentan con los menores tamaños (diámetro hidrodinámico) que podrían imitar a los cristales de hidroxiapatita naturales de los huesos humanos ( $\sim 50 \times 25 \times 2$  nm) que estamos interesados en crecer en este proyecto (Ver *Figura 4*).



**Figura 67.** Diámetro de partícula P-NaOH: **a)** PN10010. **b)** PN10020 **c)** PN10030. **d)** PN10060.

#### 7.1.4. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

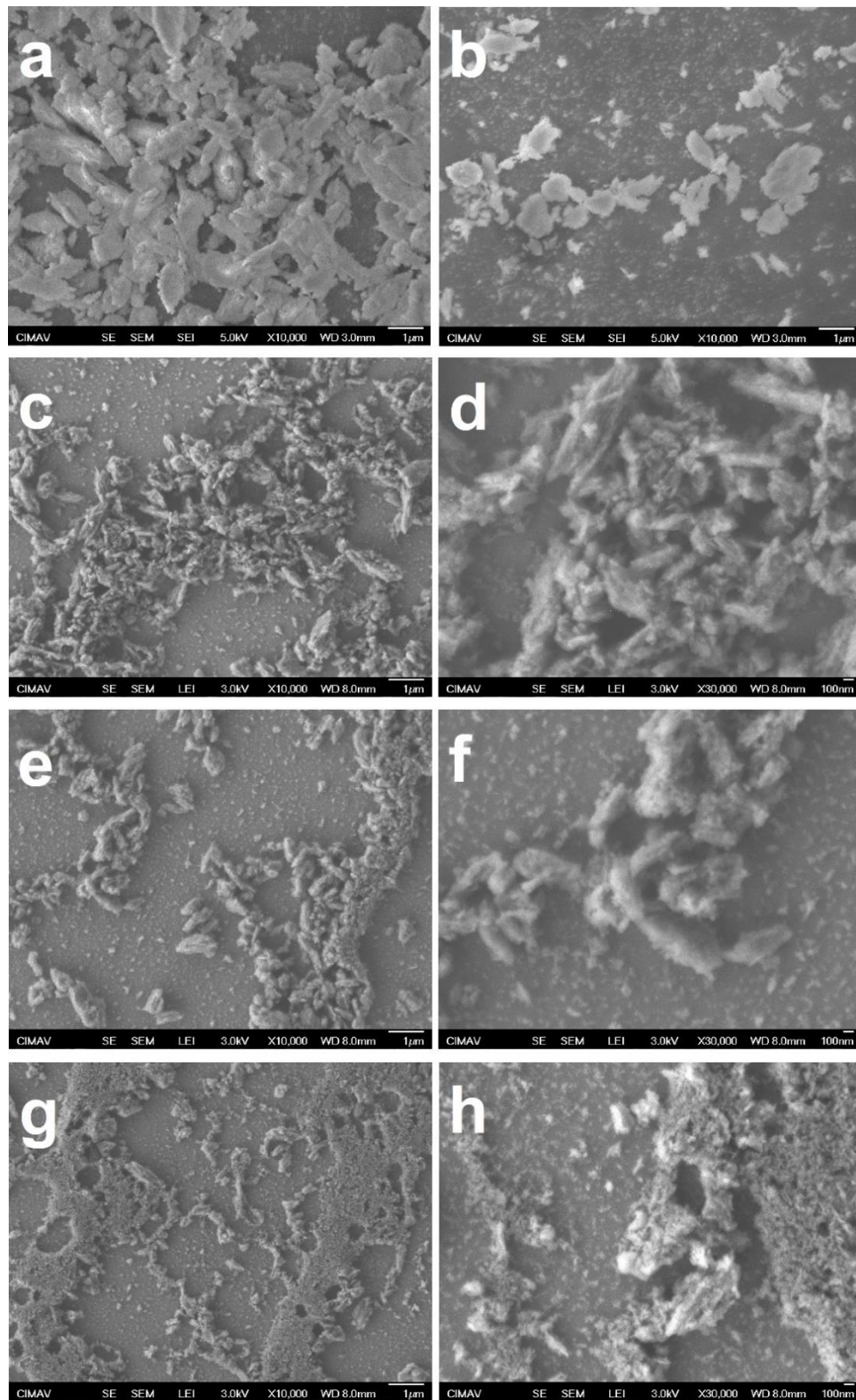


**Figura 68.** Micrográficas de SEM: **a-b)** P-Raw. **c-d)** P-KOH. **e-f)** P-NaOH.

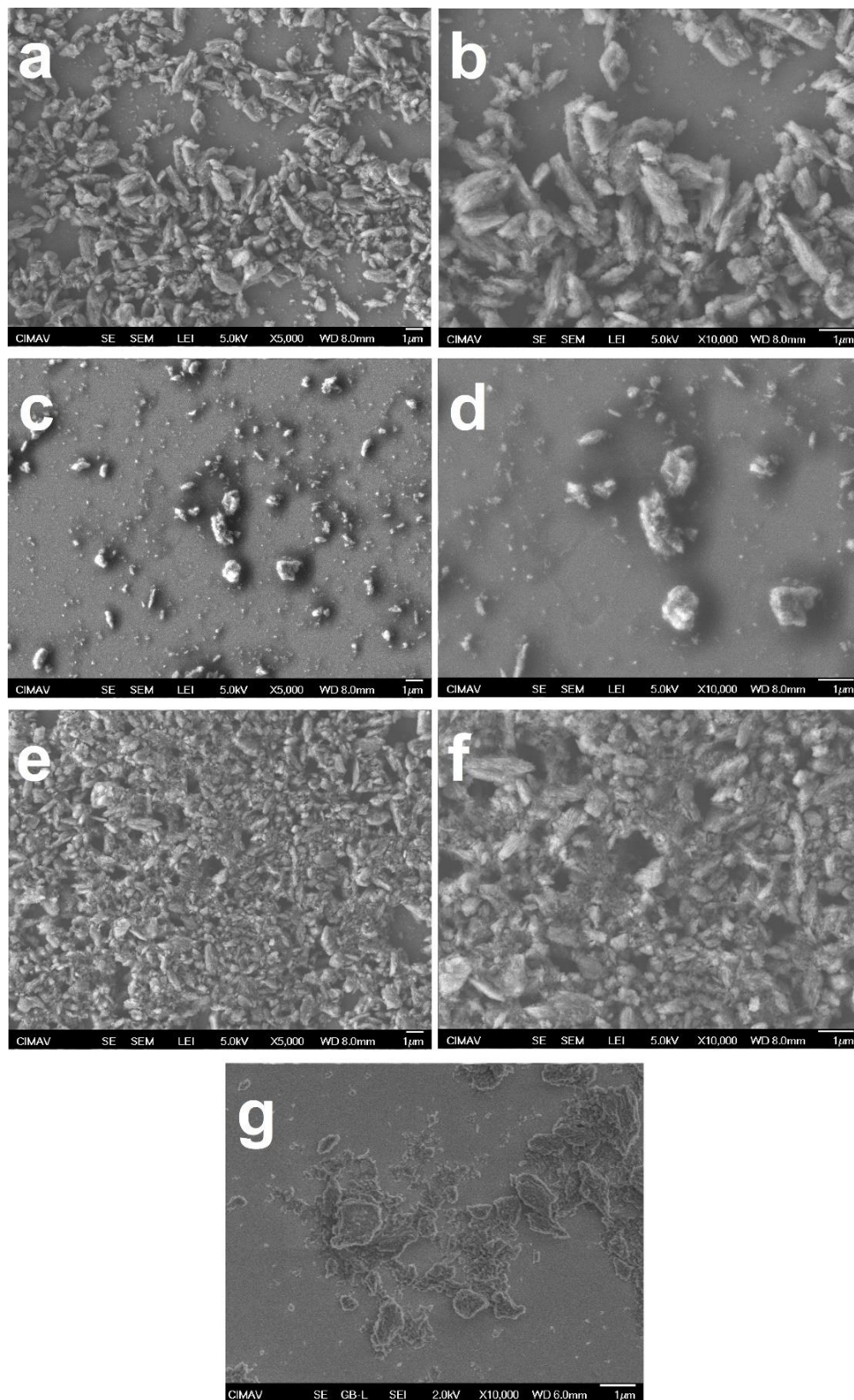
La caracterización morfológica se realizó mediante microscopia electrónica de barrido y permitió observar que las limpiezas alcalinas con los hidróxidos son eficientes en la remoción de la materia orgánica, al poderse observar que la muestra P-Raw (*Figura 68 a-b*) tiene una capa de material orgánico, así como algunas capsulas de lípidos adheridas a la superficie. Mientras que en los ejemplares P-KOH y P-NaOH (*Figura 68 c-d y 68 e-f*) se aprecia de mejor manera los gránulos de hidroxiapatita debido a que la parte orgánica se ha tirado dejando una morfología porosa entre los cristales de hidroxiapatita, lo que podría tener pros y contras. El problema sería, que la limpieza alcalina al 1 molar (KOH y NaOH) puede ser bastante agresiva y estar afectando los cristales en su estequiometría química. Sin embargo, tener una estructura porosa puede ser una solución que nos ayude al momento de realizar la sonicación, ya que por tener poros, la cavitación puede realizarse de mejor manera introduciendo burbujas dentro de los poros dejando una explosión sónica más eficiente para disminuir el tamaño de partícula.

En la *Figura 69 y 70* se observan las micrografías de las muestras de la metodología 2, las cuales fueron obtenidas con electrones secundarios (SE) para poder tener una mejor información topográfica. En las figuras se puede reportar cómo se comporta el tamaño de partícula con el tiempo de sonicación, al observar que el proceso de sonicación va degradando las partículas grandes en partículas pequeñas como lo podemos apreciar en las *Figuras 69 b, c, e-f y 70 a-d*; se ven partículas grandes y una especie de polvo alrededor de ellas que son partículas de menor tamaño, para al final en las *Figuras 69 g-h y 70 e-f*, observar que tenemos un aglomerado de nanopartículas de BIO-HAp, evidenciando que la porosidad generada en los polvos P-KOH y P-NaOH sirvió para obtener tamaños de partícula menores a 200 nm, como lo comprueban las medidas de DLS. Los tamaños de partícula en la *Figuras 69 g-h y 70 e-f* presentan la singularidad de tener dimensiones entre valores macrométricos y nanométricos, por lo que se puede catalogar lo obtenido como nanopartículas ya que poseen al menos una dimensión entre  $\sim 1 - 100$  nm, redefiniéndolas como nanopartículas de bio-hidroxiapatita (nano BIO-HAp).





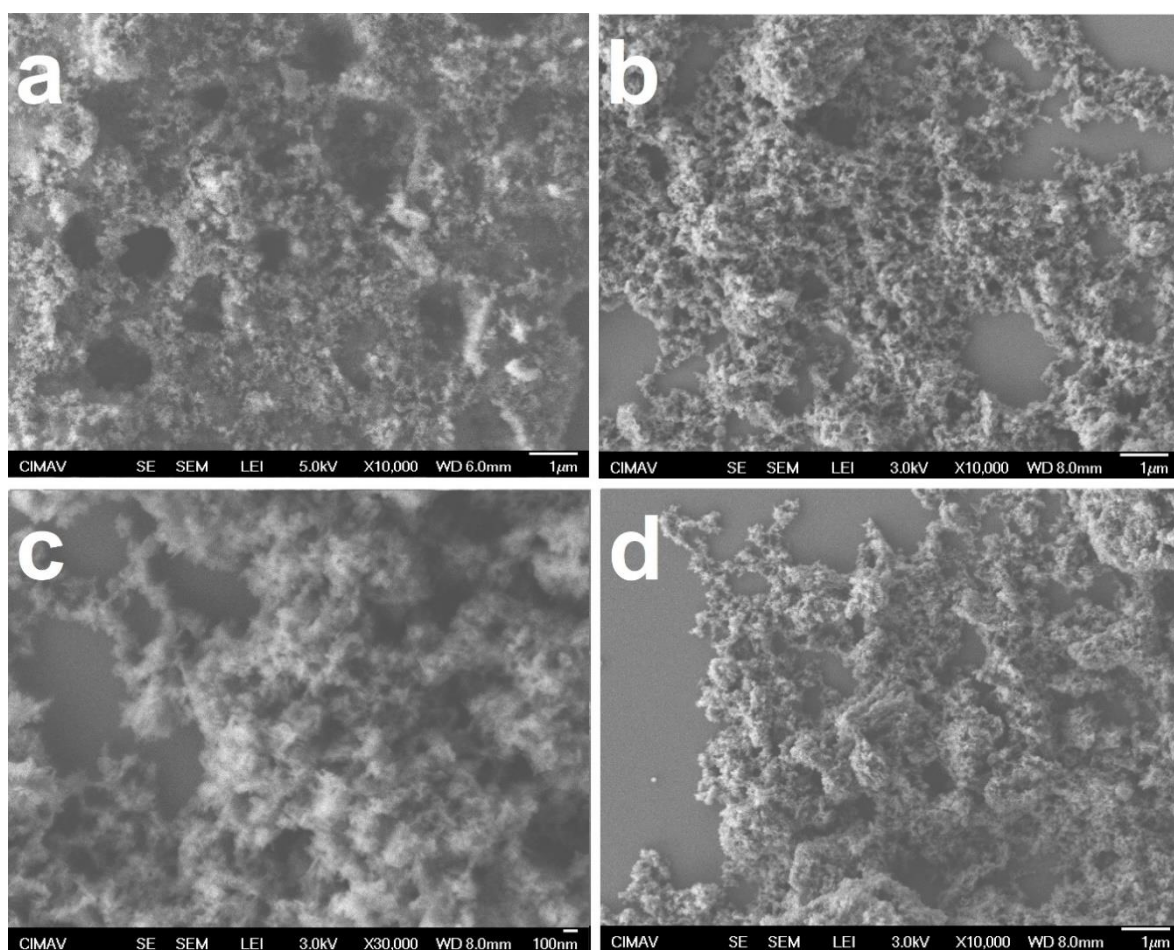
**Figura 69.** Micrografías de SEM: **a-b)** PK10010. **c-d)** PK10020. **e-f)** PK10030. **g-h)** PK10060.



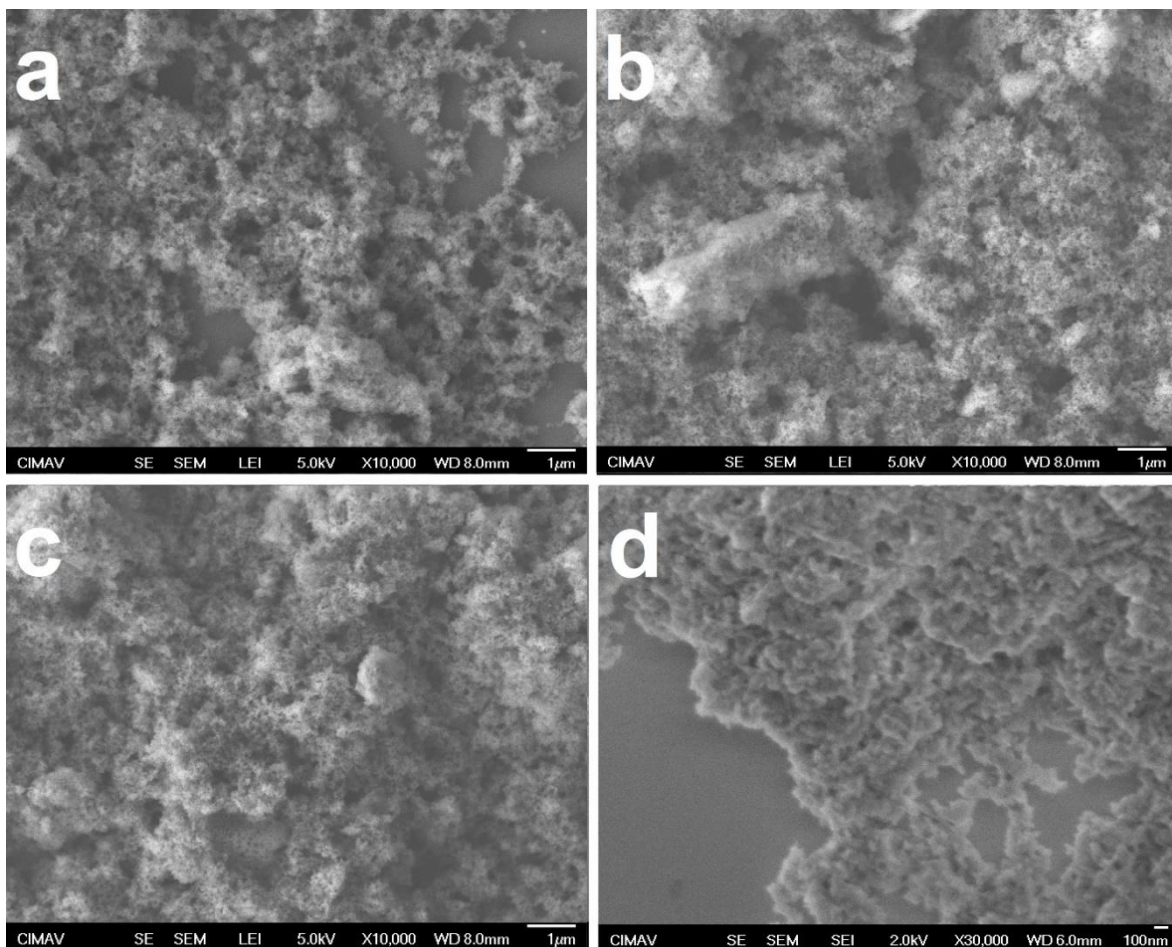
**Figura 70.** Micrografías de SEM: **a-b)** PN10010. **c-d)** PN10020. **e-f)** PN10030. **g)** PN10060.



Posteriormente, en las *Figuras 71 y 72* se puede observar las micrografías de los nanosistemas híbridos de nano BIO-HAp / HAp sintética, en las cuales podemos notar una morfología en forma de irregular y altamente poroso en la que se aglomera el material. No obstante, se trataron de realizar imágenes a mayor resolución, pero debido a las características del microscopio y de las muestras que no estaban limpias (compuestos que no reaccionaron) no se pudieron alcanzar magnificaciones mayores a x10,000, por lo que se optó por realizar microscopia electrónica de barrido de alta resolución para observar de mejor manera la morfología de las muestras.

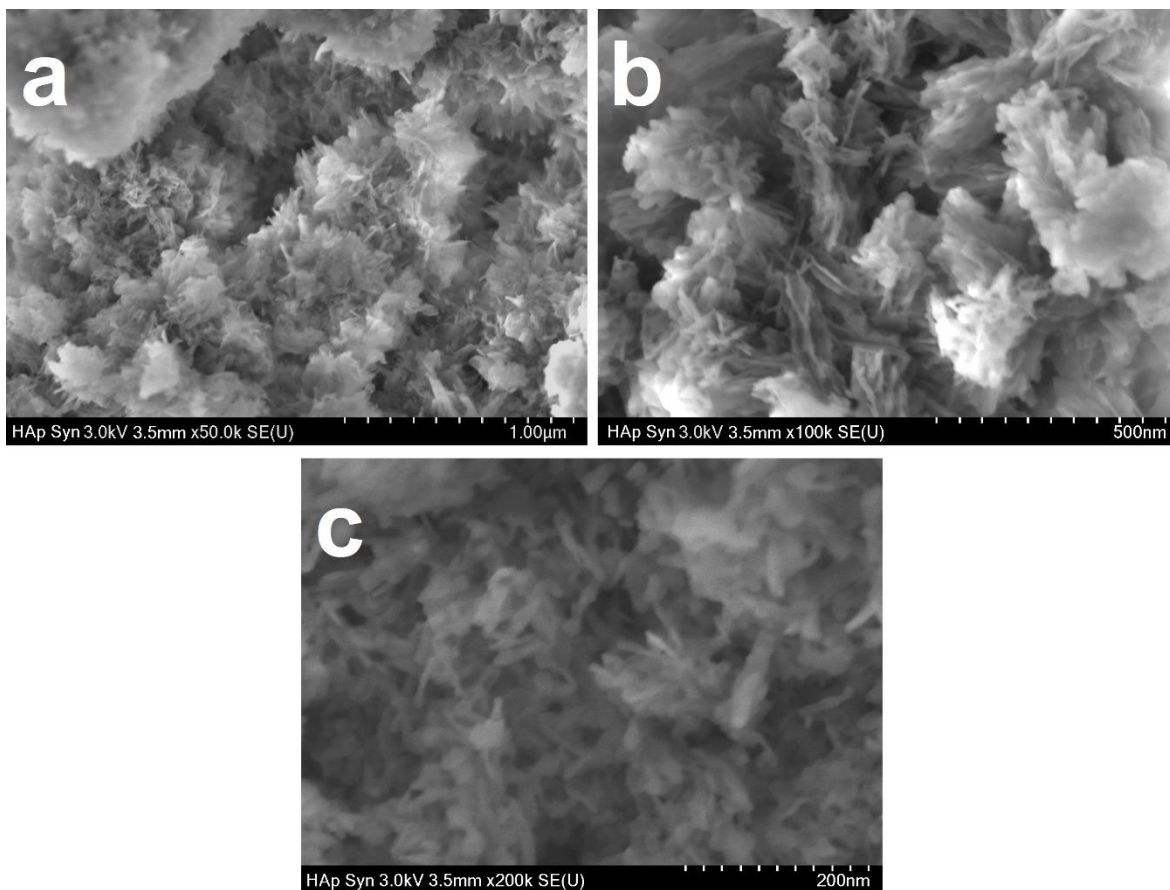


**Figura 71.** Micrografías de SEM: a) HNSPK 45. b) HNSPK 90. c) HNSPK 135. d) HNSPK 180



**Figura 72.** Micrografías de SEM: a) HNSPN 45. b) HNSPN 90. c) HNSPN 135. d) HNSPN 180

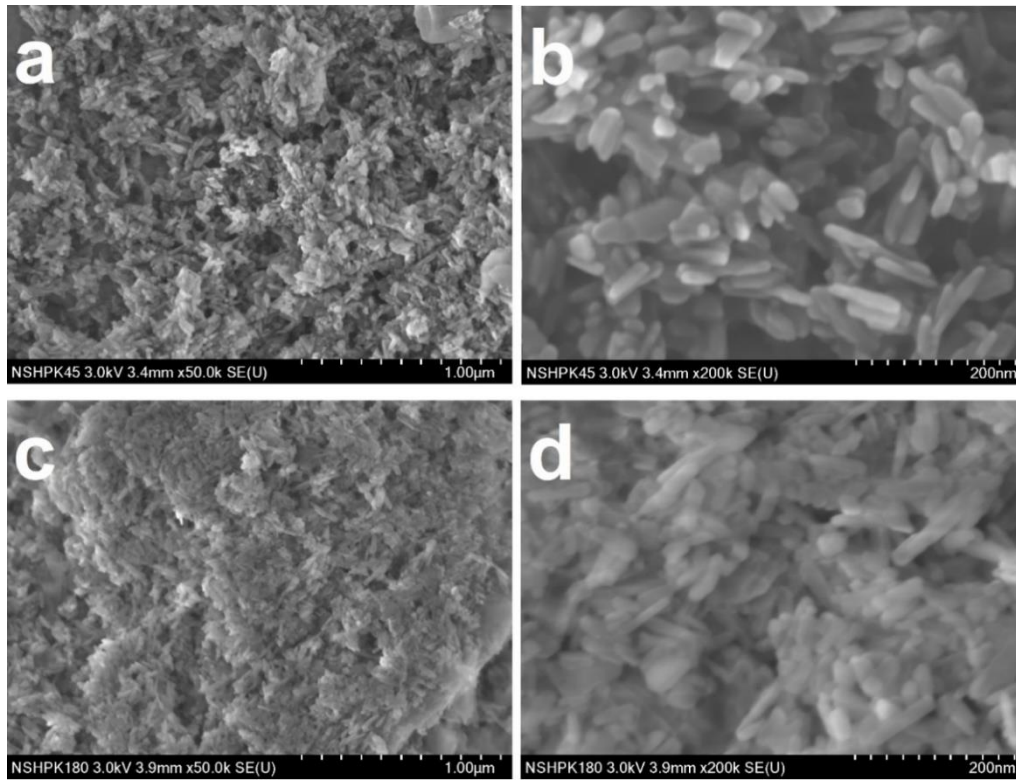
Para la caracterización por HR-SEM se analizó primero la hidroxiapatita sintética para ver que morfología se obtenía usando un pH de 9. En la *Figura 73* se puede apreciar que su morfología es en forma flores, hojuelas o escamas a una resolución de 1µm – 500 nm (*Figura 73 a-b*), sin embargo, al hacer una magnificación a x200,000 se pueden observar formas alargadas de tipo irregular delgadas como tipo lombrices (*Figura 73 c*). Estos resultados nos dan un punto de partida para observar cómo es la morfología de la HAp Syn y compararla con la forma que observamos parcialmente en las *Figuras 71* y *72* en donde notamos que si existe un cambio al agregarle las semillas de nano BIO-HAp.



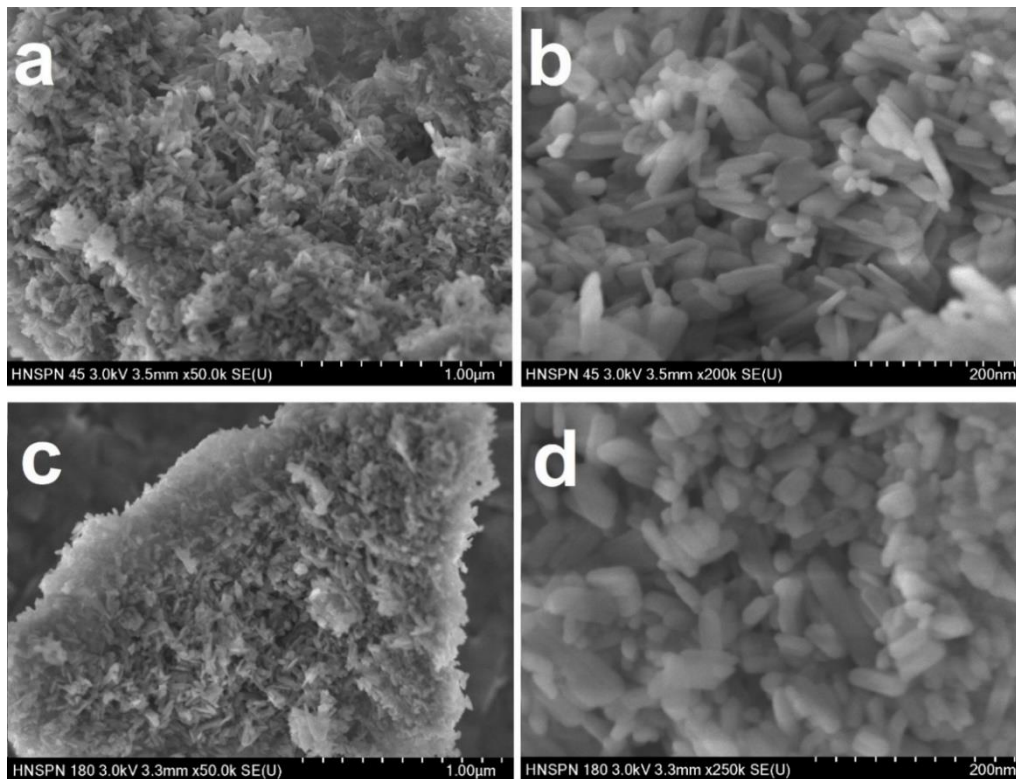
**Figura 73.** Micrografías de SEM de alta resolución: **a-c)** HAp Syn

Las muestras de HNS analizadas fueron la que tienen 45 y 180 minutos de síntesis debido a que fueron las muestras que mayor y menor tamaño obtuvimos en DLS respectivamente, así como también analizar el mecanismo de crecimiento de los cristales. En la *Figura 74* y *75* se puede notar que la morfología de los cristales de hidroxiapatita tiene forma de prismas irregulares (barras y platos) como si fueran granos de arroz. A pesar de tener una morfología de pequeños granos, se puede apreciar un cambio respecto a la porosidad intergranular entre cada grano como es evidente entre las *Figuras 74 b* y *74 d* donde la muestra HNSPK 45 tiene granos pequeños y porosidad entre grupos de granos, mientras que HNSPK 180 tiene menos porosidad y sus granos ya están más compactos entre ellos. En las figuras también se puede observar cómo estos granos tienen dimensiones promedio de largo: 70 nm y ancho: 20 nm. Cabe destacar que la *Figura 75 c* parece el interior de una geoda.



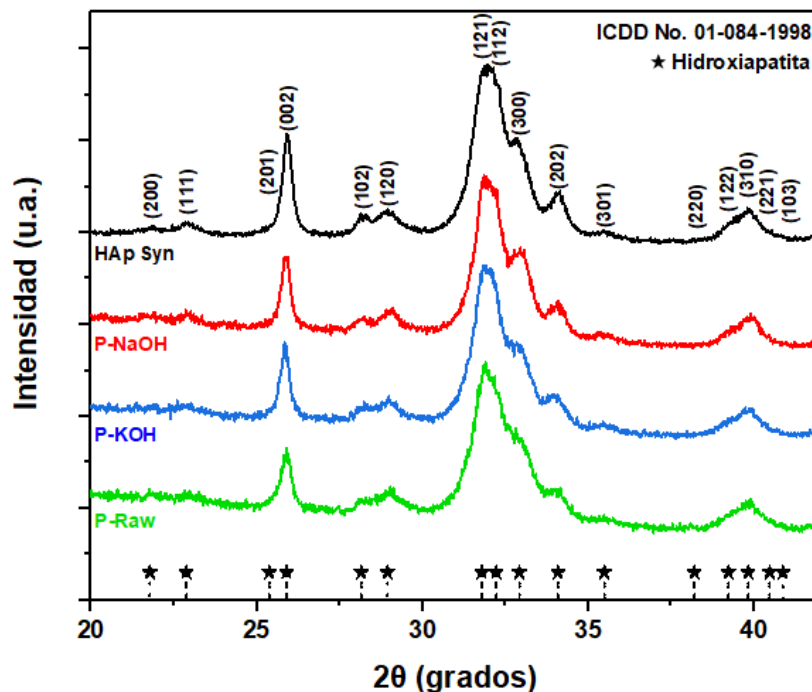


**Figura 74.** Micrografías de SEM de alta resolución: **a-b)** HNSPK 45. **c-d)** HNSPK 180.



**Figura 75.** Micrografías de SEM de alta resolución: **a-b)** HNSPN 45. **c-d)** HNSPN 180.

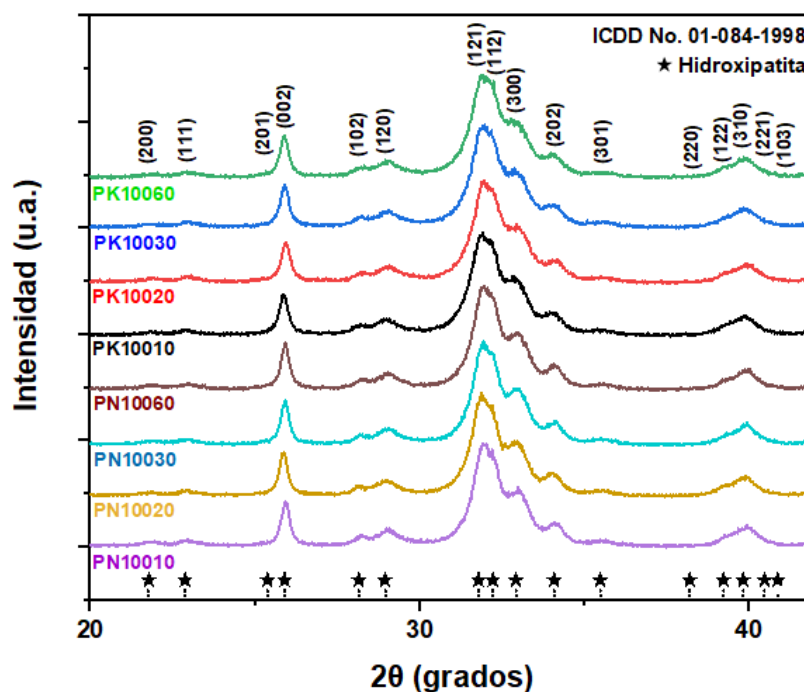
### 7.1.5. Difracción de rayos X (DRX)



**Figura 76.** Difractograma de las muestras: P-Raw, P-KOH, P-NaOH y HAp Syn.

La difracción de rayos X nos arrojó información para verificar la fase cristalina de las muestras que se identificaron con la carta del ICDD (Internacional Center for Diffraction Data) No. 01-084-1998 correspondiente a hidroxapatita, mediante la cual se pudieron observar que los picos de mayor intensidad fueron los planos (002), (121), (112), (300) y (202). Las muestras presentan una señal bastante ruidosa que generalmente es atribuida al background de la fase orgánica [57]. Aunque, no obstante, también puede ser atribuido a un efecto de la fluorescencia y dispersión dado por el tamaño de los granos de la BIO-HAp [58]. La muestra P-Raw es la muestra que mayor contribución de este factor tiene. Después con la aplicación del tratamiento alcalino se observa que varios picos tales como el de la familia de planos (200), (111), (300) y (202) incrementan su intensidad lo que es indicativo que la presencia de la materia orgánica ha disminuido o que los cristales de hidroxapatita están más expuestos y aglomerados como se puede constatar en las imágenes de SEM (Figura 68 c-f).

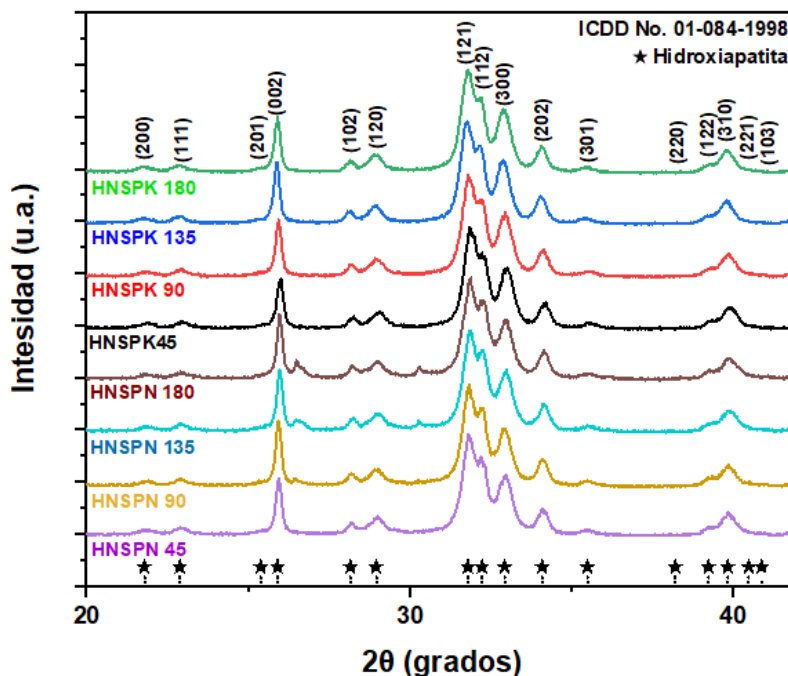
También se observa que no existe ninguna contribución significativa de los hidróxidos de limpieza por lo que el proceso de enjuague y centrifugado fue eficaz para eliminarlos. Y, por último, el ejemplar que muestra picos mejor definidos es la HAp Syn, a causa de que es de origen sintético y no tiene material orgánico, la única contribución que pudiera tener es la del tamaño del cristal como se aprecia en la *Figura 73 c*, tiene dimensiones nanométricas debido a su morfología de hojuelas.



**Figura 77.** Difractograma de las muestras con proceso de sonicación: P-KOH y P-NaOH.

Para las muestras que se sonicaron a diferentes tiempos se identificó la misma fase de hidroxiapatita, usando la misma carta del ICDD (01-084-1998) que las muestras anteriores verificando que los picos de difracción de mayor intensidad están los ubicados en los ángulos  $2\theta$ :  $25.89^\circ$ ,  $31.78^\circ$ ,  $32.21^\circ$  y  $32.92^\circ$ . A diferencia de los espectros de la *Figura 76* estos se observan más limpios en virtud que la sonicación puede afectar también la componente orgánica residual que pudieran tener debido a los procesos de cavitación. Igualmente, como se aprecia en las *Figuras 69 g-h* y *70 e-f* las partículas tienden a aglomerarse lo que también afectaría sus difracciones.

En la *Figura 78* se observan los nanosistemas híbridos en los cuales es evidente la presencia de mejor manera de picos de difracción que en las figuras anteriores no se podían percibir como es el caso de la familia de planos (112), (300), (202) y (122). Al igual que en los difractogramas se identificó una sola fase presente correspondiente a hidroxiapatita (ICDD No. 01-084-1998).

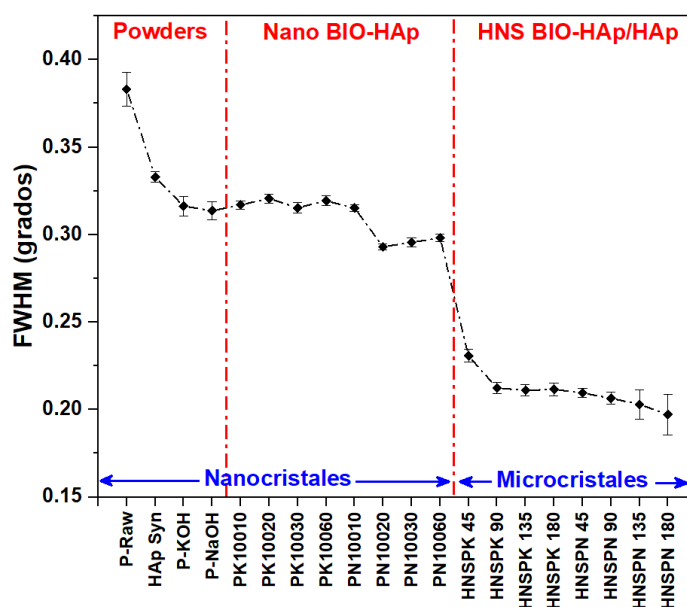


**Figura 78.** Difractograma de las muestras híbridas: HNSPK y HNSPN.

Para conocer un tamaño promedio de los cristales se usó el cálculo de la anchura a media altura (FWHM) para evaluar el efecto de cambio en el pico correspondiente a la familia de planos (002) en los difractogramas por lo que se analizaron y graficaron estos valores en la *Figura 79*, en donde podemos observar que el valor disminuye conforme tenemos el polvo crudo, limpio, sonicado y sintetizado. Este cambio puede ser explicado usando la física del estado sólido que nos dice que un cristal es un sólido que presenta un patrón de difracción no difuso y bien definido, pero un cristal está constituido por una celda unitaria que forma una de las 14 redes que Bravais que son una disposición infinita de átomos. Sin embargo, ¿Qué pasa con las nanopartículas que no son disposiciones infinitas?, para esto se usó una simulación del software PDF-4+ 2018 del ICDD [59] (*Figura 80 a*) para ver estudiar cómo

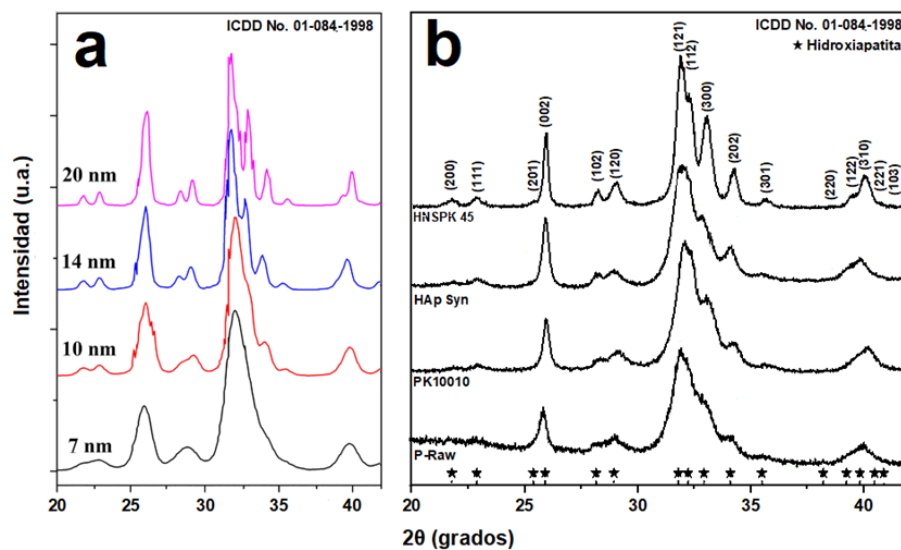
es que cambia el tamaño de cristal en los patrones de difracción de los rayos x de la hidroxiapatita usando la misma carta de difracción de este apartado (01-084-1998), donde se comparó con nuestros difractograma representativos y pudimos confirmar que el cambio en el FWHM de las muestras mientras transcurren los efectos del tratamiento, sonicación y síntesis es causado por el tamaño del cristal como se puede examinar en la *Figura 80 b*.

Para tamaños de cristal de 7 y 10 nm, los patrones corresponden a picos anchos a causa de que el polvo P-Raw están acomodados de forma alternada entre cristal de HAp (nanométrico) y molécula de colágeno (*Figura 4*) por lo que se la dispersión inelástica es mayor a la elástica (difracción de Rayos X). El tamaño del cristal es a veces la longitud de onda incidente de la radiación  $\text{CuK}\alpha$ , en esta simulación, no se consideró la contribución amorfa del material. Si bien, en la simulación, el tamaño del cristal aumenta de 14 a 20 nm, los picos anchos se vuelven más estrechos y definidos es porque la dispersión inelástica de rayos X disminuye y los picos difractados resultantes se rigen por la dispersión elástica de la estructura cristalina de la hidroxiapatita causado por su aglomeramiento, ya que al juntarse los nanocristales se vuelven como único cristal de largo alcance teniendo la difracción de mejor manera lo que hace que los valores FWHM disminuyan, aunque por SEM y TEM observamos que tiene tamaños nanométricos.



**Figura 79.** Cálculo del FWHM del plano (002) de todas las muestras.

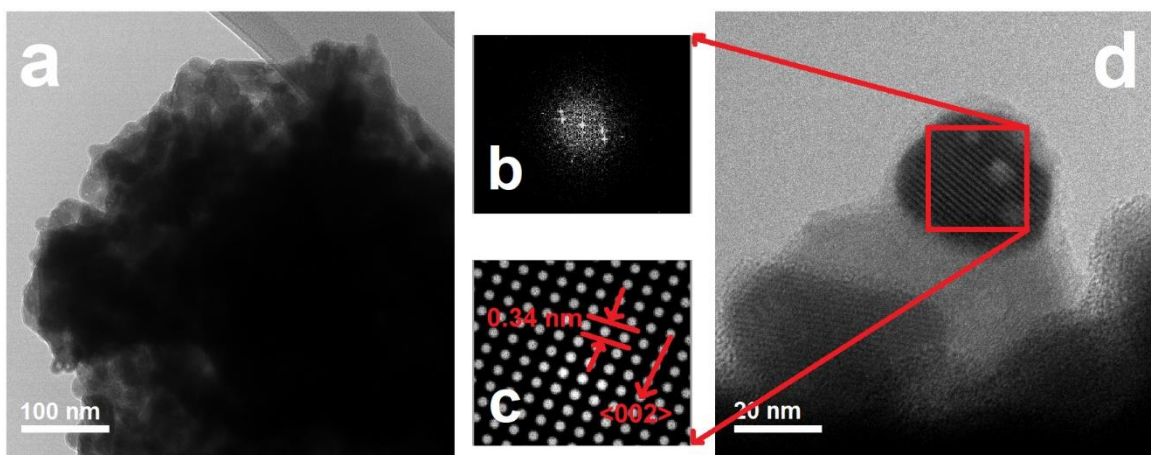




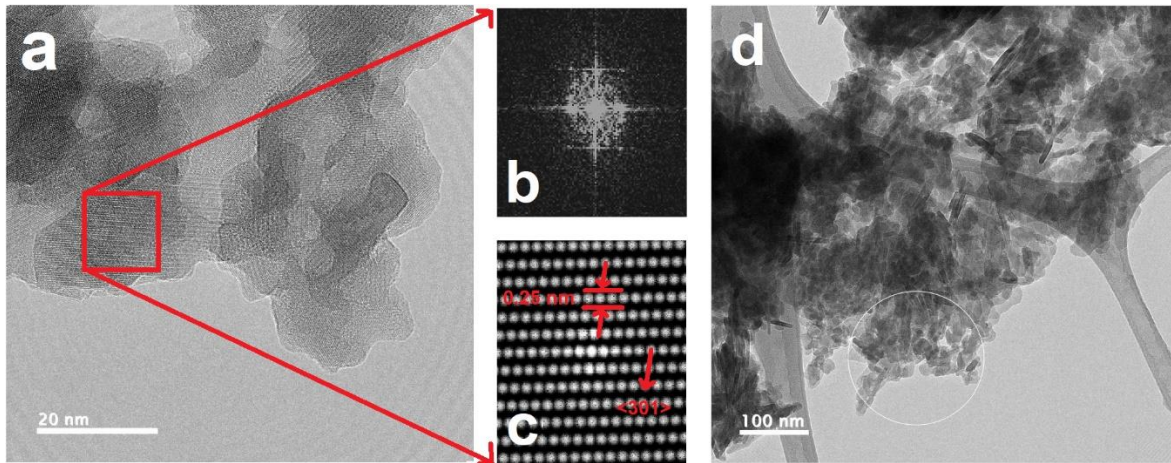
**Figura 80.** a) Simulación del tamaño de cristal (hidroxiapatita) en PDF-4. b) Difractograma de las muestras P-Raw, HAp Syn, PK10010 y HNSPK 45.

### 7.1.6. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Una vez analizado los resultados de DLS que nos arrojó la información que con el tiempo de sonicación las partículas disminuyen de tamaño y comprobado por medio de SEM a través de su morfología y tamaño, se realizó un estudio en microscopía electrónica de transmisión para observar su estructura cristalográfica a escala atómica.



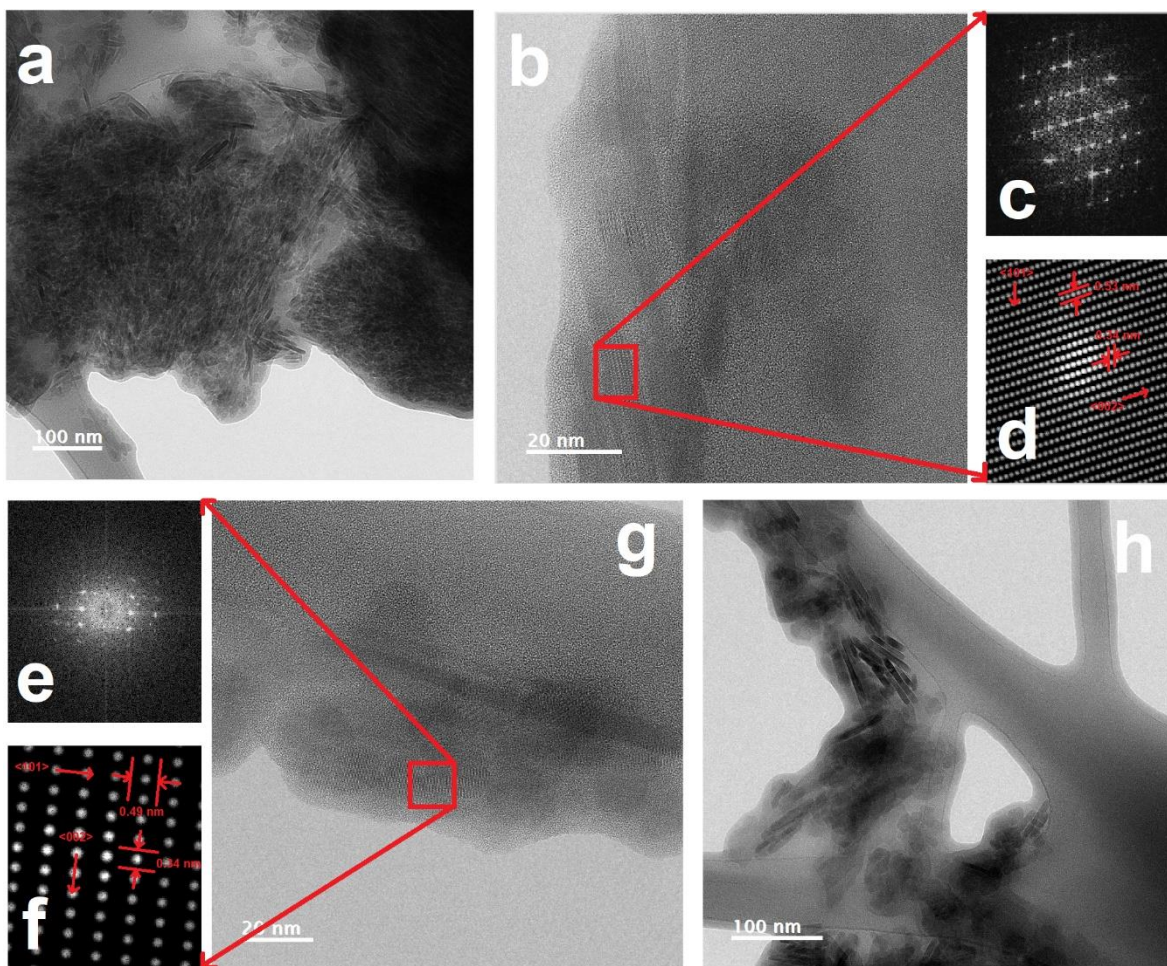
**Figura 81.** Microscopías de TEM: a-d) HAp Syn.



**Figura 82.** Micrografías de TEM: **a-d)** P-Raw.

En la *Figura 81* se puede observar las micrografías de la muestra HAp Syn a la cual se le calculo la distancia interplanar con una transformada rápida de Fourier (FFT) por medio del software Digital Micrograph de Gatan [60]. En información morfológica de la muestra se puede apreciar en la *Figura 81 a* que existe un cumulo de cristales de hidroxiapatita en forma de platos similar a la *Figura 73* de SEM. Para la estructura cristalina, la distancia interplanar obtenida del cálculo por medio de FFT (*Figura 81 b*) en un área de la *Figura 81 d* haciendo una simulación de la red cristalina (*Figura 81 c*) nos arrojó una distancia entre planos de 0.34 nm por lo que pudimos identificar por medio de la carta ICDD No. 01-084-1998 que corresponde a la dirección  $\langle 002 \rangle$ . La *Figura 82* muestra a P-Raw en donde la distancia interplanar es de 0.25 nm y una morfología de cristales de pequeños granos diferente a la HAp Syn.

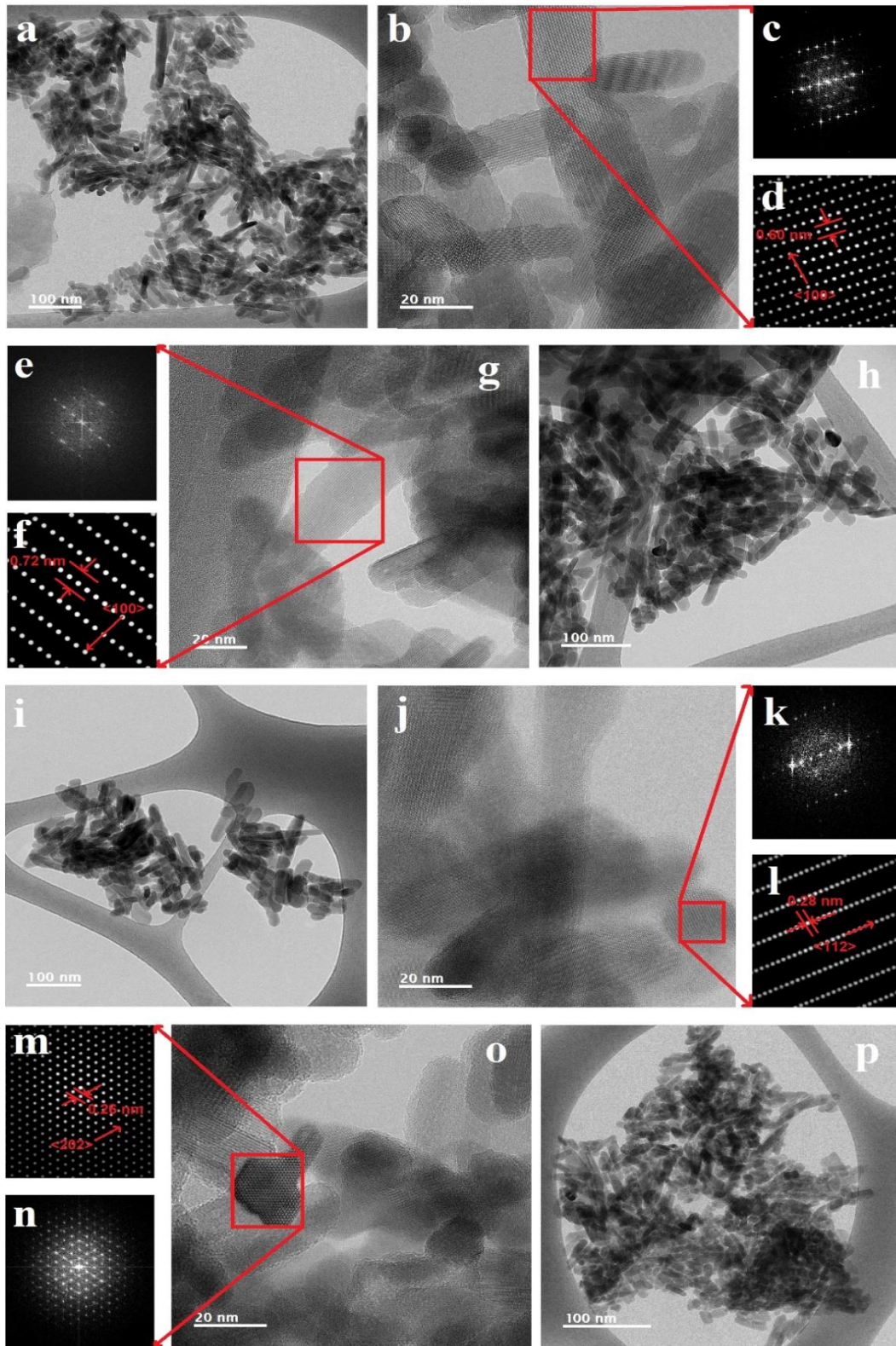
En la *Figura 83* se pueden observar las muestras PK10060 y PN10060 las cuales fueron tomadas como nanosemillas para los HNS. En la *Figuras 82 a* y *82 h* se contemplan cristales se hidroxiapatita de forma bacilos de tamaño promedio de 25 nm. En tanto que las que las simulaciones (*Figura 82 c-f*) nos arrojaron distancia interplanares de 0.53 – 0.49 y 0.34 nm de las direcciones  $\langle 101 \rangle$  y  $\langle 002 \rangle$  respectivamente.



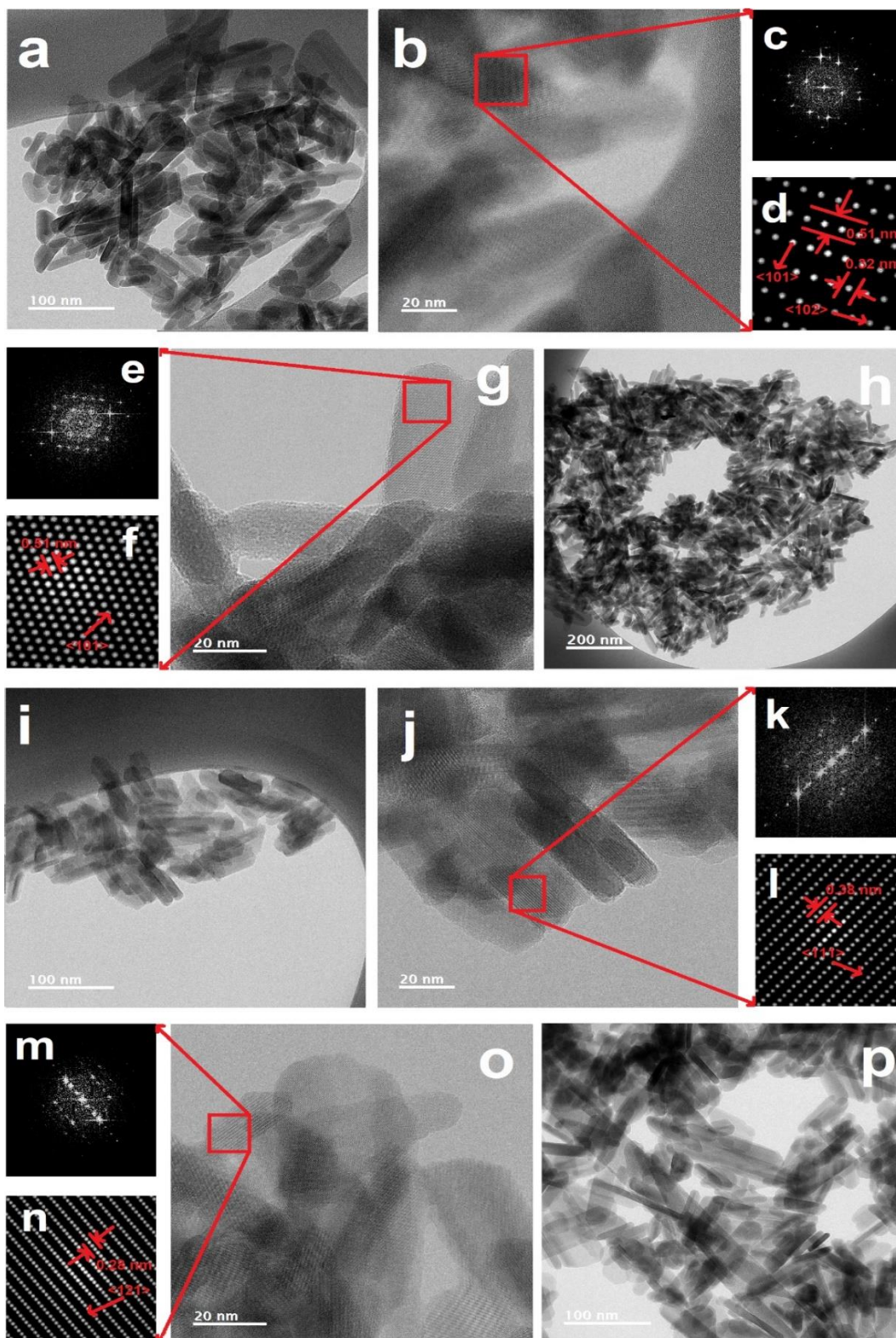
**Figura 83.** Micrográficas de TEM: **a-d)** PK10060. **e-h)** PN10060.

Finalmente, en la *Figuras 84 y 85* se analizaron los HNSPK y HNSPN. En ambas figuras se puede observar una morfología general análoga a las nanosemillas (*Figura 83*), son barras alargadas en forma de prismas, que tienen dimensiones de a nm. Ambas muestras tienen imágenes de FFT y simulaciones de redes cristalinas. Las distancias interplanares más comunes pertenecieron a planos (100), (112), (202), (101), (102), (111) y (121) característicos de la hidroxiapatita (ICDD No. 01-084-1998). Por lo que podemos observar también, es que los nanosistemas híbridos son presentan una alta cristalinidad y tiene un arreglo de orden atómico. En la *Figura 84 d y m, 85 d y f* se puede observar una celda unitaria de forma hexagonal, propia de la HAp.





**Figura 84.** Micrografías de TEM: **a-d)** HNSPK45. **e-h)** HNSPK90. **i-l)** HNSPK 135. **m-p)** HNSPK 180.



**Figura 85.** Micrografías de TEM: **a-d)** HNSPN45. **e-h)** HNSPN90. **i-l)** HNSPN 135. **m-p)** HNSPN 180.



Tipo	Fuente	Tratamiento	Muestras	Distribución de tamaño (nm)	Características	Morfología		
HAp	Natural (Bio-HAp)	Limpieza alcalina	P-Raw	20 x 7		* Iones sustitucionales * Grasas, proteínas, colágeno y ADN * Nanocristales * Alta calidad cristalina	Platos Prismas alargados	
			P-KOH	-				
	P-NaOH		-					
	Natural (Nano Bio-HAp)	Porcino (Fémur: Córtil)	Sonoquímica (100w)	10 min	280 - 260 & 240 - 210		-	Prismas Gránulos
				20 min	230 - 215 & 210 - 190		-	
				30 min	180 - 165 & 180 - 165		-	
	60 min			160 - 155 & 165 - 160	25 x 5			
	Sintética (Syn)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O NH <sub>4</sub> OH en (pH:9)	Síntesis	Hap Syn	35 x 10		* Nanocristales * Alta calidad cristalina	Hojuelas Escamas
	Nanosistemas híbridos (HNS)	Natural & Sintética		45 min	45 x 10		* Nanocompositos	Prismas Gránulos
				90 min	50 x 13		* Nanocristales	
135 min				57 x 10		* Crecimientos en dirección C		
180 min				63 x 10		* Alta calidad cristalina		

**Tabla 4.** Cuadro comparativo de las hidroxiapatitas y los nanosistemas híbridos.

## VIII. CONCLUSIONES

- La metodología de limpieza alcalina con los hidróxidos (KOH y NaOH) demostró la remoción de materia orgánica propia de la matriz del hueso porcino animal, como se apreció en los análisis de espectroscopia infrarroja con la atenuación de las bandas relacionadas a grasas y proteínas. El análisis termogravimétrico contribuyó a determinar la completa eliminación al observar una mínima cantidad de masa perdida y por último, la microscopia electrónica nos ayudó de manera cualitativa a observar la superficie limpia.
- Se demostró que la metodología de sonicación basada en tiempo de exposición de 10, 20, 30 y 60 minutos a 100 W disminuyó el tamaño de partícula, como se calculó en la dispersión dinámica de luz con el diámetro hidrodinámico, mientras que las microscopias demostraron que la cavitación va degradando poco a poco el material cerámico en nanopartículas con forme al tiempo de exposición hasta llegar a un tamaño donde se empiezan a aglomerar.
- Las microscopias electrónicas de barrido nos ayudaron a observar los cambios de morfología con el tratamiento alcalino, la sonicación y la síntesis. En la que pudimos apreciar que la limpieza alcalina hace poroso el material, lo que ayuda al proceso de cavitación (sonicación). En la muestra HAp Syn se observó la morfología de nanoflores en forma de hojuelas mientras que los nanosistemas híbridos de BIO-HAp / HAp son de forma de primas irregulares-hexagonales como granos de arroz.
- Se identificó la única y principal fase en los difractogramas que correspondió a hidroxiapatita con la carta del ICDD No. 01-084-1998, además se calculó el tamaño de cristal por medio del FWHM del pico (002), el cual demostró que el carácter nanométrico es importancia para considerar debido a los efectos de dispersión inelástica del material, pasando de nanopartículas a micropartícula, así como también los aglomerados de cristales afectan cómo se comporta el material en bulto, dando una interpretación diferente a la reportada en la literatura.



- Se demostró a través de TEM que las muestras presentan alta cristalinidad al evidenciar la presencia de cristales con forma ordenada, refutando la teoría errónea que mientras más amorfo los difractogramas menos calidad cristalina tienen. La estructura cristalina de los nanosistemas híbridos analizada por medio del software Gatan aplicando una FFT en la cual se simuló la red cristalina se obtuvieron distancias interplanares típicas de la hidroxiapatita en los planos (100), (112), (202), (101), (102), (111) y (121).
- El trabajo sirvió como comienzo en el estudio del crecimiento de hidroxiapatita sintética con semillas de nano BIO-HAp, para poder usar la forma natural de los cristales para la cristalización de la forma sintética, con la finalidad de realizar en un futuro un recubrimiento en frío para una pieza metálica, así como se observó parcialmente como es el mecanismo de formación al analizar los tamaños de partícula, dejando la evidencia que crece de forma preferencial en el eje C.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Rebolledo-Cobos, M., Harris-Ricardo, J., Higgins-Samper, E., & Molinares-Carmargo L. (2011). Cicatrización y regeneración ósea de los maxilares después de una quistectomía: reporte de un caso y revisión de la literatura. *Universitas Odontológica*, 30(65), 71-78.
- [2] O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88–95. [https://doi.org/10.1016/s1369-7021\(11\)70058-x](https://doi.org/10.1016/s1369-7021(11)70058-x)
- [3] Nather, A. (2005). Bone grafts and bone substitutes: Basic science and clinical applications. In *Bone Grafts and Bone Substitutes: Basic Science and Clinical Applications*. World Scientific Publishing Co. <https://doi.org/10.1142/5695>
- [4] Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2017). *Cellular and molecular immunology* (9th Ed) . Elsevier. <https://www.elsevier.com/books/cellular-and-molecular-immunology/abbas/978-0-323-47978-3>
- [5] Shin, S. Y., Rios, H. F., Giannobile, W. V., & Oh, T.-J. (2015). Periodontal Regeneration. In A. Vishwakarma, P. Sharpe, S. Shi, & M. Ramalingam (Eds.), *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences* (pp. 459–469). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-397157-9.00040-0>
- [6] Londoño-Restrepo, S. M., Ramirez-Gutierrez, C. F., del Real, A., Rubio-Rosas, E., & Rodriguez-García, M. E. (2016). Study of bovine hydroxyapatite obtained by calcination at low heating rates and cooled in furnace air. *Journal of Materials Science*, 51(9), 4431–4441. <https://doi.org/10.1007/s10853-016-9755-4>
- [7] Barakat, N. A. M., Khil, M. S., Omran, A. M., Sheikh, F. A., & Kim, H. Y. (2009). Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods. *Journal of Materials Processing Technology*, 209(7), 3408–3415. <https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2008.07.040>
- [8] Ramirez-Gutierrez, Cristian F., Palechor-Ocampo, A. F., Londoño-Restrepo, S. M., Millan-Malo, B. M., & Rodriguez-García, M. E. (2016). Cooling rate effects on thermal, structural, and microstructural properties of bio-hydroxyapatite obtained from bovine bone. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 104(2), 339–344. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33401>

- [9] Londoño-Restrepo, S. M., Jeronimo-Cruz, R., Rubio-Rosas, E., & Rodriguez-García, M. E. (2018). The effect of cyclic heat treatment on the physicochemical properties of bio hydroxyapatite from bovine bone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29(5), 52. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6061-5>
- [10] Ramirez-Gutierrez, C.F., Londoño-Restrepo, S. M., del Real, A., Mondragon, M. A., & Rodriguez-García, M. E. (2017). Effect of the temperature and sintering time on the thermal, structural, morphological, and vibrational properties of hydroxyapatite derived from pig bone. *Ceramics International*, 43(10), 7552–7559. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.03.046>
- [11] Barua, E., Das, A., Pamu, D., Deoghare, A. B., Deb, P., Lala, S. Das, & Chatterjee, S. (2019). Effect of thermal treatment on the physico-chemical properties of bioactive hydroxyapatite derived from caprine bone bio-waste. *Ceramics International*. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.08.023>
- [12] García-Garduño, M. V., & Reyes-Gasga, J. (2006). La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 9(2), 90–95.
- [13] Londoño-Restrepo, Sandra M., Jeronimo-Cruz, R., Millan-Malo, B. M., Rivera-Muñoz, E. M., & Rodriguez-García, M. E. (2019). Effect of the Nano Crystal Size on the X-ray Diffraction Patterns of Biogenic Hydroxyapatite from Human, Bovine, and Porcine Bones. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42269-9>
- [14] Giraldo-Betancur, A. L., Espinosa-Arbelaez, D. G., Del Real-López, A., Millan-Malo, B. M., Rivera-Muñoz, E. M., Gutierrez-Cortez, E., & Rodriguez-García, M. E. (2013). Comparison of physicochemical properties of bio and commercial hydroxyapatite. *Current Applied Physics*, 13(7), 1383–1390. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2013.04.019>
- [15] Espíndola-Cortés, A., Moreno-Tovar, R., Bucio, L., Gimeno, M., Ruvalcaba-Sil, J. L., & Shirai, K. (2017). Hydroxyapatite crystallization in shrimp cephalothorax wastes during subcritical water treatment for chitin extraction. *Carbohydrate Polymers*, 172, 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.055>
- [16] Secretaría de Salud: Dirección General de Información en Salud. (2018). *Sistema de Información de la Secretaría de Salud: Datos en Salud*. Gobierno de México. <http://sinaiscap.salud.gob.mx:8080/DGIS/>

- [17] Welsch, U., & Sobotta, J. (2008). *Histología* (2nd Ed.). Editorial Médica Panamericana.
- [18] Drake, R., Vogl, W. A., & Mitchell, A. (2019). *Gray's Anatomy for Students* (4th Ed.). Elsevier.
- [19] Ross, M. H., & Pawlina, W. (2007). *Histología: Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular* (5th Ed.). Editorial Médica Panamericana.
- [20] Londoño-Restrepo, Sandra M. (2016). *Estudio de la cinética de formación granular de BIO-HAP como función de la temperatura* [tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. Tesis del Sistema Bibliotecario de la UNAM. <http://132.248.9.195/ptd2015/junio/0730639/Index.html>
- [21] Campa-Molina, J., Ulloa-Godínez, G. S., Bucio-Galindo, L., Belio, I. A., Velázquez-Castillo, R., & Rivera-Muñoz, E. M. (2007). *Biomateriales: fundamentos, técnicas y aplicaciones*. Universidad de Guadalajara.
- [22] Gómez-Ortega, J. L., Elizondo-Villareal, N., & Guerrero-Villa, H. M. (2004). Visualización cristalográfica de la hidroxiapatita. *Ingenierías*, 7(24), 46-50.
- [23] Londoño, M. E., Echeverría, A., & De la Calle, F. (2006). Características cristalográficas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. *Revista EIA*, 5, 109-118.
- [24] Nasiri-Tabrizi, B., Fahami, A., & Ebrahimi-Kahrizangi, R. (2014). A comparative study of hydroxyapatite nanostructures produced under different milling conditions and thermal treatment of bovine bone. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(1), 245–258. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.03.041>
- [25] Ghedjemis, A., Benouadah, A., Fenineche, N., Ayeche, R., Hatim, Z., Drouiche, N., & Lounici, H. (2019). Preparation of hydroxyapatite from Dromedary Bone by Heat Treatment. *International Journal of Environmental Research*, 13(3), 547–555. <https://doi.org/10.1007/s41742-019-00198-5>
- [26] Shi, P., Liu, M., Fan, F., Yu, C., Lu, W., & Du, M. (2018). Characterization of natural hydroxyapatite originated from fish bone and its biocompatibility with osteoblasts. *Materials Science and Engineering C*, 90, 706–712. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.026>
- [27] Chaudhuri, B., Mondal, B., Modak, D. K., Pramanik, K., & Chaudhuri, B. K. (2013). Preparation and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite from eggshell and

- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> solution. *Materials Letters*, 97, 148–150.  
<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.01.082>
- [28] Wang, Z., Jiang, S., Zhao, Y., & Zeng, M. (2019). Synthesis and characterization of hydroxyapatite nano-rods from oyster shell with exogenous surfactants. *Materials Science and Engineering: C*, 105, 110102. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110102>
- [29] Klinkaewnarong, J., & Utara, S. (2018). Ultrasonic-assisted conversion of limestone into needle-like hydroxyapatite nanoparticles. *Ultrasonics Sonochemistry*, 46, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.04.002>
- [30] Weißenböck, M., Stein, E., Undt, G., Ewers, R., Lauer, G., & Turhani, D. (2006). Particle size of hydroxyapatite granules calcified from red algae affects the osteogenic potential of human mesenchymal stem cells in vitro. *Cells Tissues Organs*, 182(2), 79–88. <https://doi.org/10.1159/000093062>
- [31] Mohd Pu'ad, N. A. S., Koshy, P., Abdullah, H. Z., Idris, M. I., & Lee, T. C. (2019). Syntheses of hydroxyapatite from natural sources In *Heliyon* (Vol. 5, Issue 5). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01588>
- [32] Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., Dinpanah-Khoshdargi, E., & Jamshidi, A. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 9, Issue 8, pp. 7591–7621). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>
- [33] Gousterova, A., Nustorova, M., Goshev, I., Christov, P., Braikova, D., Tishinov, K., Haertlé, T., & Nedkov, P. (2003). Alkaline hydrolysate of waste sheep wool aimed as fertilizer. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 17(2), 140–145. <https://doi.org/10.1080/13102818.2003.10817072>
- [34] Suslick, K. S. (1990). Sonochemistry. *Science*, 247(4949), 1439–1445. <https://doi.org/10.1126/science.247.4949.1439>
- [35] Suslick, K. S. (1989). The chemical effects of ultrasound. *Scientific American*, 260(2), 80–86. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0289-80>
- [36] Smith, B. C. (2011). Fundamentals of fourier transform infrared spectroscopy, second edition. In *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Second Edition*. <https://doi.org/10.1201/b10777>

- [37] Stuart, B. H. (2004). Introduction: Electromagnetic Radiation. In *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications* (pp. 1–13). ANTS (Analytical Techniques in the Sciences) Series.
- [38] Skoog, D. A., Crouch, S. R., & Holler, F. J. (2016). *Instrumental Analysis Principles* (7th Ed). Cengage Learning.
- [39] Bradley, M. (n.d.). FTIR Spectroscopy Basics | Thermo Fisher Scientific - MX. Retrieved November 27, 2019, from <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-basics.html>
- [40] Brown, M. E. (2001). Thermal Events. In *Introduction to Thermal Analysis* (pp. 13-17). Kluwer Academic Publishers. [https://doi.org/10.1007/0-306-48404-8\\_2](https://doi.org/10.1007/0-306-48404-8_2)
- [41] Coats A. W., & Redfern J. P. (1963). Thermogravimetric Analysis: A Review. *The Analyst*. 88 (1053): 906-924 . <https://doi.org/10.1039/AN9638800906>
- [42] Sakho, E. H. M., Allahyari, E., Oluwafemi, O. S., Thomas, S., & Kalarikkal, N. (2017). Dynamic Light Scattering (DLS). In S. Thomas, R. Thomas, A. Zachariah, & K. Raghvendra (Eds.), *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization* (pp. 37–49). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46139-9.00002-5>
- [43] Hammond, C. (2015). *The Basics of Crystallography and Diffraction* (4th Ed.). IUCr/Oxford Science Publications.
- [44] Cullity, B. D., & Stock, S. R. (2014). *Elements of X-Ray Diffraction* (3rd Ed.). Pearson.
- [45] Prince, E. (2006). *International Tables for Crystallography Volume C: Mathematical, physical and chemical tables: Vol. C* (E. Prince (ed.)). International Union of Crystallography. <https://doi.org/10.1107/97809553602060000103>
- [46] He, B. B. (2009). Goniometer and Samples Stages. In *Two-Dimensional X-Ray Diffraction* (pp. 1–426). John Wiley and Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470502648>
- [47] Eikenberry, E. F., Barna, S. L., Tate, M. W., Rossi, G., Wixted, R. L., Sellin, P. J., & Gruner, S. M. (1998). A pixel-array detector for time-resolved X-ray diffraction. *Journal of Synchrotron Radiation*, 5(3), 252–255. <https://doi.org/10.1107/s0909049597015069>

- [48] Egas-Ribadeneira, D. (1998). *Microscopia Electrónica: Fundamentos, Teoría y Aplicaciones*. Escuela Politécnica Nacional.
- [49] Egerton, R. F. (2005). Physical principles of electron microscopy: An introduction to TEM, SEM, and AEM. In *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/b136495>
- [50] Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Michael, J. R., Ritchie, N. W. M., Scott, J. H. J., & Joy, D. C. (2018). *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6676-9>
- [51] Londoño-Restrepo, S. M., Zubieta-Otero, L. F., Jeronimo-Cruz, R., Mondragon, M. A., & Rodriguez-García, M. E. (2019). Effect of the crystal size on the infrared and Raman spectra of bio hydroxyapatite of human, bovine, and porcine bones. *Journal of Raman Spectroscopy*. <https://doi.org/10.1002/jrs.5614>
- [52] Bahrololoom, M. E., Javidi, M., Javadjpour, S., & Ma, J. (2009). Characterisation of natural hydroxyapatite extracted from bovine cortical bone ash. *Journal of Ceramic Processing Research*, 10(2), 129–138
- [53] Shaltout, A. A., Allam, M. A., & Moharram, M. A. (2011). FTIR spectroscopic, thermal and XRD characterization of hydroxyapatite from new natural sources. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 83(1), 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.07.036>
- [54] Tavakol, S., Nikpour, M. R., Amani, A., Soltani, M., Rabiee, S. M., Rezayat, S. M., Chen, P., & Jahanshahi, M. (2013). Bone regeneration based on nano-hydroxyapatite and hydroxyapatite/chitosan nanocomposites: an in vitro and in vivo comparative study. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(1), 1373. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1373-8>
- [55] Londoño-Restrepo, Sandra M., Ramirez-Gutierrez, C. F., Villarraga-Gómez, H., & Rodriguez-García, M. E. (2019). Study of microstructural, structural, mechanical, and vibrational properties of defatted trabecular bovine bones: natural sponges. In *Materials for Biomedical Engineering* (pp. 441–485). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816901-8.00014-6>



- [56] Degirmenbasi, N., Kalyon, D. M., & Birinci, E. (2006). Biocomposites of nanohydroxyapatite with collagen and poly(vinyl alcohol). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 48(1), 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.01.002>
- [57] Jerónimo-Cruz, Rodrigo. (2018). *Análisis estructural de bio-hidroxiapatita de porcino obtenida mediante incineración controlada* [tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. Tesis del Sistema Bibliotecario de la UNAM. <http://132.248.9.195/ptd2018/agosto/0778540/Index.html>
- [58] Londoño-Restrepo, Sandra M., Millán-Malo, B. M., del Real-López, A., & Rodríguez-García, M. E. (2019). In situ study of hydroxyapatite from cattle during a controlled calcination process using HT-XRD. *Materials Science and Engineering: C*, 105, 110020. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110020>
- [59] International Center for Diffraction Data. (2018). *PDF-4+ 2018, 2018 Powder Diffraction File*. ICDD. <http://www.icdd.com/pdf-4>
- [60] Gatan. (2019). *Digital Micrograph* (3.32.2403.0). Gatan, Inc. <https://www.gatan.com/resources/software>

# X. PUBLICACIONES

Journal of Luminescence 201 (2018) 11–17



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Luminescence

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jlumin](http://www.elsevier.com/locate/jlumin)



## Photoluminescence study of porous p-type silicon: Identification of radiative transitions



Cristian F. Ramirez-Gutierrez<sup>a</sup>, Andrés Medina-Herrera<sup>b</sup>, Liliana Tirado-Mejía<sup>b</sup>,  
Luis F. Zubieta-Otero<sup>a</sup>, Orlando Auciello<sup>c</sup>, Mario E. Rodriguez-García<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro 76230, Mexico

<sup>b</sup> Grupo de Optoelectrónica, Instituto Interdisciplinario de las Ciencias, Universidad del Quindío, Carrera 15 Calle 12 Norte, Armenia 630004, Colombia

<sup>c</sup> Material Science & Eng Department and Bioengineering Department, University of Texas-Dallas, 800 W. Campbell Rd., RL10, Richardson, TX 75080-3021, USA

<sup>d</sup> Departamento de Nanotecnología, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro 76230, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Photoacoustic  
Photoluminescence  
Lighting-time dependence  
Bilayers  
Pseudo lattice  
Surface states

### ABSTRACT

The research discussed in this paper focused on a systematic methodology to elucidate the controversy about transitions responsible for the photoluminescence (PL) spectrum from porous silicon (PSi) layers etched on a p-type Si wafer, to understand the nature of light emitting mechanisms from PSi. The PL spectrum of PSi, as a function of temperature, shows the existence of broad peaks, initially associated with stable surface states. However, the PL studies as a function of time, under continuous laser fluency, shows the presence of electronic states due to silicon columns (quantum confinement) and the metastable surface states. Finally, the PL studies, during which the laser was cut off for several hours, confirm that the surface states are metastable. Based on the information provided by these studies, the interpretation of the results indicates that the PL spectrum of PSi is a superposition of porous surface states and states originated in the porous layer considered as a pseudo lattice of the Si bulk.

### 1. Introduction

Photoluminescence (PL) of porous silicon (PSi) has attracted attention in recent years because of its relevance in optoelectronics and sensors applications, and in low dimensional materials physics. There is still a controversy about the origin of each one of the photoluminescence bands, and it is an open scientific and technological problem. It is well known that PL bands may originate mainly from quantum confinement phenomena [1–3], surface states related to surface chemistry [4–6], and internal material's interface [7,8]. In fact, PL generated in silicon (Si) nanostructures arises from complexly inter-related quantum confinement and surface chemistry effects [9], and seems to be because non-interface states are present between Si (substrate) and PSi layers, because silicon columns have not lattice mismatch with the substrate.

The PL spectrum of PSi is strongly dependent on the fabrication parameters, such as lighting conditions, growing temperature, electrolyte composition, and the intrinsic parameters of the substrate such as the impurity type (p or n), the crystalline orientation, dopant concentration [10], impurities distribution [11], and crystalline quality

[12]. In addition, the PL spectrum also depends on extrinsic conditions such as material storage [2,13], oxidation grade of the surface of PSi, and aging time. Extrinsic and intrinsic parameters involved in the fabrication of PSi, as described above, produce layers with a diversity of mechanical, structural, thermal, and optical properties [2].

Regarding possible applications, an important feature that PSi may offer is as a material for a new generation of anodes with the highest volumetric and gravimetric energy density for Li-ion batteries (LIBs). In this sense, Si, which is cheap and abundant, exhibits the highest energy density known of any LIB's anode material (~ 3.579 mA h/g for Li<sub>3.75</sub>Si) [14]. However, to accommodate up to 3.75 Li atoms per silicon atom, the silicon structure undergoes a tremendous volume expansion (> 250%) upon lithiation, resulting in cracking and disintegration of the electrode and severe energy capacity loss [14]. One approach to solve this problem is to produce micro or nanostructured Si anodes that can accommodate the strain. To solve this issue, various methods have been proposed: a) disperse Si nanoparticles between aligned graphene sheets to form a Si/graphene composite [15]; b) flexible graphene sheets that accommodate large volume variations during charge/discharge cycling, preventing particle aggregation, and resulting in

\* Corresponding author.

E-mail address: [marioga@fata.unam.mx](mailto:marioga@fata.unam.mx) (M.E. Rodriguez-García).

<https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.04.036>



Received 23 February 2018; Received in revised form 13 April 2018; Accepted 16 April 2018  
Available online 17 April 2018

0022-2313/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.04.036>



# Effect of the crystal size on the infrared and Raman spectra of bio hydroxyapatite of human, bovine, and porcine bones

Sandra M. Londoño-Restrepo<sup>1</sup>  | Luis F. Zubieta-Otero<sup>1</sup> | Rodrigo Jeronimo-Cruz<sup>2</sup> | Maria Antonieta Mondragon<sup>3</sup> | Mario E. Rodriguez-García<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico

<sup>2</sup>Licenciatura en Tecnología, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico

<sup>3</sup>Departamento de Nanotecnología, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico

## Correspondence

Mario E. Rodriguez, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Querétaro, Querétaro, Mexico.  
Email: marioga@fata.unam.mx

## Funding information

PAPIIT-Universidad Nacional Autónoma de México, Grant/Award Number: IN112317; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-Mexico)

## Abstract

The optical properties of hydroxyapatites (HAp) and bio HAp have been studied using Raman and infrared (IR) spectroscopies to describe their crystalline quality. However, the size of the HAp crystals and their crystalline order effects have not been considered yet. This paper focuses on the study of the effect of the change in the crystallites size have on the width of the IR and Raman spectra for defatted and deproteinized bones as well as incinerated biogenic HAp obtained from bovine, porcine, and human bones. Bone samples were analyzed through Raman and IR spectroscopies, X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM), inductively coupled plasma (ICP), and scanning electron microscopy (SEM). The Raman and IR spectra for raw samples showed broad bands but, after calcination at 720 °C, became narrow and well defined. TEM images showed that all raw crystallites are ordered nanoplates contrary to the so far well-established concept that biogenic HAp have low crystalline quality. XRD data confirmed that raw samples display broad peaks that correlated with the HRTEM images of ordered nanocrystals. This fact confirmed that the broad Raman and IR bands of raw clean bones come from nanocrystal plates. SEM analysis confirmed the increase in the crystal size after calcination from nanomicro to submicron dimensions due to a coalescence phenomenon. These results imply that the interpretation of Raman and IR spectra in the case of HAp nanoparticles has been erroneous. These results contribute to the design of biomaterials for tissue engineering based on biogenic HAp for bone regeneration.

## KEYWORDS

crystalline quality, FWHM, hydroxyapatite, infrared, Raman

## 1 | INTRODUCTION

Nowadays, bioceramic materials like hydroxyapatites (HAp) are growing in importance in different fields, particularly in tissue engineering for clinical applications. The natural apatite from mammalian bones is called biogenic HAp (BIO-HAp), and its main difference with synthetic

apatites is that this is carbonated and contains other elements such as Na, Mg, Mn, and Fe, among others.<sup>[1,2]</sup>

The physicochemical characterization of raw bones and BIO-HAp obtained through different methodologies is still an open problem due to their complexity. Infrared (IR) and Raman spectroscopies have been extensively used to study these materials, monitoring the removal of