



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales

“Análisis de granulometría e índice
de cristalinidad del hueso bovino”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

P R E S E N T A

FIS. GALOIS RODRÍGUEZ ÁLVAREZ

Tutor: Dr. José Reyes Gasga

IFUNAM

MÉXICO, D.F. Junio 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Por el apoyo que siempre me ha brindado a Lucía Rodríguez Álvarez.

A todas aquellas personas que me han apoyado y quienes creyeron en mí.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis el Dr. José Reyes Gasga, por la orientación y apoyo que me brindó para la realización de este trabajo.

Al personal del IFUNAM Pedro Mexia Hernandez, Samuel Tehuacanero Nuñez, Manuel Aguilar Franco, Antonio Gómez Cortés, Pedro Huidoboro Galán y Mario Monroy Escamilla así como también a Miguel Ángel Canseco Martínez del IIM sin cuyo apoyo este trabajo no podría haberse llevado a cabo.

Al Dr. Xim Bokhimi y su grupo de estudiantes por los conocimientos obtenidos en su curso.

A los miembros del jurado y de mi comité tutor por el tiempo que dedicaron a la revisión de este trabajo. Dra. María Cristina Piña Barba, Dr. José Reyes Gasga, Dr. Roberto Olayo González, Dr. Lauro Bucio Galindo, Dra. María Maricela Garcés Ortiz y Dr. José Chávez Carvayar.

Al CONACyT por el apoyo económico a través del proyecto DGAPA-UNAM (IN-106713).

Al CONACyT por la beca proporcionada durante mi primer semestre en la maestría No. Registro: 329262, No. Beca: 53028.

Contenido

| | |
|---|----|
| Resumen | 1 |
| Introducción | 2 |
| Antecedentes | 2 |
| Índice de cristalinidad obtenido por DRx | 2 |
| Índice de cristalinidad obtenido por FTIR | 3 |
| Planteamiento del problema..... | 3 |
| Justificación..... | 4 |
| Objetivo general | 4 |
| Objetivos específicos | 4 |
| Hipótesis | 5 |
| Capítulo 1. Hueso | 6 |
| Estructura y composición | 6 |
| Tipos de hueso..... | 7 |
| Hueso compacto..... | 7 |
| Hueso esponjoso..... | 7 |
| El hueso a estudiar | 8 |
| Capítulo 2. Hidroxiapatita..... | 10 |
| Hidroxiapatita sintética | 10 |
| Cristalografía | 11 |
| Hidroxiapatita biológica | 11 |
| Usos y aplicaciones..... | 11 |
| Capítulo 3. Granulometría..... | 13 |
| El concepto de granulometría | 13 |
| Técnicas para la Medida de la granulometría | 14 |
| Medida del tamaño de cristal mediante la difracción de rayos x..... | 14 |
| Medida del tamaño de cristal mediante TEM..... | 14 |
| Capítulo 4. El índice de cristalinidad | 15 |
| Concepto de cristalinidad | 15 |

| | |
|--|----|
| Medida del índice de cristalinidad | 15 |
| Índice de cristalinidad medido por DRx | 16 |
| Índice de cristalinidad medido por FTIR | 17 |
| Capítulo 5. Técnicas de observación y análisis | 19 |
| Microscopía Óptica | 19 |
| Microscopía electrónica de barrido (SEM) | 20 |
| Microscopía electrónica de transmisión (TEM) | 21 |
| Difracción de Rayos X (DRx) | 22 |
| Espectroscopía infrarroja (FTIR) | 23 |
| Refinamiento Rietveld | 23 |
| Capítulo 6. Metodología | 26 |
| Preparación de la muestra | 26 |
| Preparación de muestras para microscopía óptica | 27 |
| Preparación de muestras para SEM | 27 |
| Preparación de muestras para DRx, TEM y FTIR | 28 |
| Capítulo 7. Presentación de resultados | 29 |
| Microscopía Óptica | 29 |
| Resultados de SEM | 31 |
| Resultados de EDS | 32 |
| Resultados de TEM | 39 |
| Resultados de granulometría por TEM | 41 |
| Resultados de FTIR | 46 |
| Resultados de DRx | 47 |
| Refinamiento Rietveld | 47 |
| Cálculo de los Índices de Cristalinidad $(IC)_{DRx}$ y $(IC)_{FTIR}$ | 48 |
| Cálculo del porcentaje de cristalinidad | 50 |
| Capítulo 8. Discusión | 52 |
| Conclusiones | 55 |
| Referencias | 56 |
| Anexo: Estadística | 60 |
| Distribución Log-Pearson 3 | 60 |
| Distribución Burr | 60 |

| | |
|--|----|
| Distribución Pearson 6..... | 61 |
| Distribución Dagum | 62 |
| Distribución Pareto (segundo tipo) | 62 |
| Distribución Log-Logistic..... | 63 |
| Distribución Weibull | 63 |
| Distribución Lognormal | 64 |
| Distribución Johnson SB..... | 65 |
| Prueba de Kolmogorov-Smirnov..... | 66 |
| Anexo 2: Tratamiento de imágenes..... | 67 |

Resumen

El tamaño de grano y el tamaño de cristal son dos medidas muy importantes en el estudio de materiales debido a que estos parámetros juegan un papel relevante en las propiedades mecánicas que presenta el material en estudio. Recientemente en el campo de la arqueología se han implementado métodos para medir estos parámetros y usarlos de forma práctica en la caracterización de fósiles. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito con detenimiento el significado físico exacto de los valores que se obtienen. Por lo tanto, nos hemos dado a la tarea de calcular estos parámetros en hueso y compararlos con los datos de tamaño de grano y tamaño de cristal obtenidos por técnicas de microscopía electrónica.

En este trabajo de tesis se midió el tamaño de grano (granulometría) y la cristalinidad del hueso bovino por técnicas de difracción de rayos x (DRx), espectroscopia infrarroja (FTIR) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). De igual manera, la estructura y composición química del hueso fue analizado por microscopia electrónica de barrido (SEM) y DRx.

Se utilizaron dos muestras de diáfisis de radio bovino, H13 y HS1. Los resultados indican que el índice cristalino medido por DRx fue de .011 y .965, mientras que el índice cristalino medido por FTIR fue de .088 y .309 por el método de áreas y de 3.579 y 4.319 por el método de líneas. El tamaño de cristal obtenido por la ecuación de Scherrer fue de 45.57 y 356.80 nm, mientras que el tamaño de cristal medido por TEM fue de 1 ± 1 y 7.5 ± 2.5 nm para el ancho, 2.5 ± 2.5 y 15 ± 5 nm para el largo y un área de 25 ± 25 y de 250 ± 250 nm² respectivamente. El tamaño de cristal medido por TEM presentó una desviación estándar muy grande.

Los resultados de este trabajo de tesis indican, por lo tanto, que el índice de cristalinidad medido por las técnicas de difracción de rayos X y por espectroscopía infrarroja presenta valores diferentes, aunque mantienen una tendencia semejante en cuánto al incremento de la cristalinidad. Cualitativamente el uso de estas técnicas es una forma rápida de obtener la cristalinidad relativa de las muestras.

Introducción

El concepto de índice de cristalinidad en la materia se relaciona con la fracción de volumen cristalino de una fase en una muestra. Así, de cierta manera el índice indica el grado de orden estructural en un sólido. Por lo tanto, el índice de cristalinidad tiene una gran influencia directa sobre las propiedades físicas y químicas de los materiales. Debido a su relación con la parte cristalina de una fase, el índice de cristalinidad debe estar directamente relacionado con el tamaño de grano (granulometría) que presentan los materiales.

Antecedentes

El índice de cristalinidad se ha medido desde 1966 por FTIR y DRx, buscando desde entonces alternativas para obtenerlo e intentando constantemente mejorar la fiabilidad de los métodos.

A continuación se mencionan algunos artículos representativos sobre el índice de Cristalinidad

Índice de cristalinidad obtenido por DRx

Entre los estudios para obtener el índice de cristalinidad utilizando DRx tenemos:

- Person (1995). Utiliza el índice de cristalinidad en DRx pues provee una manera semicuantitativa de estimar los cambios diagenéticos en el fosfato hueso arqueológico y paleontológico [9].
- Sari (2007) relaciona la cristalinidad por DRx con la edad en ratas y encuentra que la cristalinidad disminuye con la edad [29].
- Merino (2008) Estudia la cristalinidad por DRx en muestras actuales y fósiles pertenecientes a esmalte, dentina y hueso de metápodos. Se observa que el esmalte presenta un índice de cristalinidad mayor que la dentina [33].

Índice de cristalinidad obtenido por FTIR

Entre los estudios para obtener el índice de cristalinidad utilizando FTIR tenemos:

- Termine (1966) Estudia la cristalinidad en hueso de rata por FTIR y reporta una relación lineal entre el grado de división (SF) del modo antisimétrico y el porcentaje de cristalinidad (fracción en peso de la apatita cristalina) [5].
- Miller (2001) utiliza la vibración $\nu_4 PO_4^{3-}$ (distinta a la tradicional $\nu_1, \nu_3 PO_4^{3-}$) que ha sido usada para monitorear la cristalinidad de la hidroxiapatita en muestras de hueso homogeneizada, obtenidos con sincrotrón [30].
- Farlay (2009) Estudia, utilizando FTIR, la relación entre la madurez mineral (transformación de dominios no apatíticos en apatíticos) y el índice de cristalinidad encontrando que son características distintas del mineral óseo [31].
- Abraham (2011) Estudia la cristalinidad de tejidos dentales por FTIR. Menciona que el estudio de la cristalinidad puede ser usado para diagnosticar enfermedades relacionadas a la disolución de la masa ósea, por ejemplo la osteoporosis. Así también en la manufactura de prótesis, pues se espera que los fosfatos de calcio que cubren los elementos prostéticos tengan características similares a las del hueso y tengan una cristalinidad similar [32].
- Balan (2011) Estudia la cristalinidad por FTIR, el ensanchamiento de las líneas en la fluorapatita y la hidroxiapatita. Afirma que el ancho de la banda de absorción $\nu_1 PO_4$ provee información confiable sobre las fuentes microscópicas de ensanchamiento (cristalinidad del apatito) [15].

Planteamiento del problema

Las preguntas que se desea contestar, usando de modo práctico los conocimientos adquiridos en el Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales y que permita el analizar y describir estructural y químicamente el hueso a estudiar, son: ¿cómo está constituido estructuralmente el hueso bovino? y ¿cuáles son propiedades físicas y químicas relacionadas? Es más, ¿cuál es el porcentaje de material inorgánico que contiene este hueso? A ese porcentaje se le llama índice de cristalinidad. Esta es la motivación de este trabajo de tesis.

El índice de cristalinidad se obtiene a partir de los difractogramas de rayos x y de los espectros de espectroscopia infrarroja, como se describirá más adelante. En el campo de la arqueología han usado estas técnicas y los valores obtenidos como marco de referencia para establecer las edades de los fósiles. Sin embargo, existen varias preguntas sobre el tipo de parámetro que estas medidas representan y su significado físico. Por lo tanto, nos hemos dado a la tarea de calcular estos parámetros en el caso del hueso bovino con la idea de establecer más claramente la relación de estos valores con algún parámetro físico del material.

Justificación

El presente trabajo se lleva a cabo debido a la importancia que tienen en el campo de la Ciencia de Materiales parámetros como el tamaño de grano en una muestra, el número de fases presentes en la muestra y la forma del cristal. La cristalinidad y por tanto el tamaño de los cristales en hidroxiapatita está relacionada con sus propiedades físicas y químicas. Determinar de manera rápida estos parámetros en el material sería importante para procesos de control de calidad. El índice de cristalinidad de un material se relaciona con la fracción de volumen cristalino de una fase en una muestra. Este trabajo podrá servir como base a otros y así obtener un beneficio social como puede ser el desarrollo de prótesis.

Objetivo general

Estudiar la granulometría y cristalinidad de la diáfisis del radio bovino por las técnicas de DRx, FTIR, y TEM y correlacionar todas estas técnicas para elucidar los parámetros físicos-cristalográficos que se encuentran involucrados en cada una de las medidas obtenidas.

Objetivos específicos

- Caracterizar por microscopia óptica y SEM el hueso bovino.
- Determinar por EDS, DRx y TEM la composición química, la granulometría y estudio cristalográfico del hueso

- Caracterizar por FTIR el hueso bovino
- Relacionar los valores del índice de cristalinidad obtenido por FTIR, DRx y TEM.

Hipótesis

Los valores del índice de cristalinidad obtenidos por FTIR, DRx y TEM representan un medio rápido y sencillo para medir de forma cuantitativa el índice de cristalinidad de una muestra.

Capítulo 1. Hueso

En esta sección presentaremos los conceptos generales del hueso como lo son su estructura, composición, los tipos de hueso, así como se presentan las características generales del hueso sujeto de estudio de este trabajo de tesis.

Estructura y composición

El hueso es una estructura que permite al organismo sostenerse, además permite el movimiento, protege a los órganos internos y en su interior sucede la formación de células sanguíneas.

En el nivel más básico el hueso puede ser considerado como un material compuesto que consiste de una proteína fibrosa, colágena, endurecido por cristales de fosfato de calcio. Hay otros constituyentes, tales como agua, algunas proteínas y polisacáridos, células vivas y vasos sanguíneos [1].

En promedio el hueso está compuesto de 25% de agua, 45% de minerales como fosfato y carbonato de calcio y 30% de materia orgánica, principalmente colágeno y otras proteínas. Así, los componentes inorgánicos alcanzan aproximadamente 2/3 (65%) de la masa ósea y tan solo un 35% es orgánico.[2]

La hidroxiapatita estequiométrica, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ presenta una razón de Ca/P de 1.667 . Los cristales de hidroxiapatita biológica son impuros. En particular, hay alrededor de 4 a 6% de carbonato reemplazando los grupos fosfato, haciendo del mineral más bien una apatita carbonatada. Esta sustitución de carbonato toma lugar más cerca de las orillas del hueso [1].

Los materiales inorgánicos de los huesos son constantemente intercambiados y reemplazados junto con los componentes orgánicos en un proceso que se conoce como remodelación ósea.

Tipos de hueso

El hueso puede ser: hueso compacto o hueso esponjoso.

Hueso compacto

El hueso compacto, también llamado hueso cortical es denso y tiene una matriz ósea que está rellena sólidamente de sustancia orgánica fundamental y sales inorgánicas, dejando sólo pequeños espacios (lagunas) que contienen a los osteocitos, o células óseas. El hueso compacto representa el 80 por ciento del esqueleto humano, el resto es hueso esponjoso. Ambos tipos se encuentran en la mayoría de los huesos. El hueso compacto es el componente principal de los huesos largos, donde su mayor resistencia y rigidez son necesarias [3].

El hueso compacto maduro tiene una estructura laminar, o en capas. Está permeado por un elaborado sistema de canales vasculares interconectados, los sistemas de Havers, los cuales contienen el suministro de sangre para los osteocitos, el hueso está dispuesto en capas concéntricas alrededor de estos canales, formando unidades llamadas osteonas. El hueso compacto inmaduro no contiene osteonas y tiene una estructura tejida. Se forma alrededor de un marco de fibras de colágena y es eventualmente sustituido por hueso maduro en un proceso remodelante de resorción ósea y formación de hueso nuevo que crea a las osteonas [3].

Hueso esponjoso

El Hueso esponjoso o trabecular es ligero y poroso y encierra numerosos espacios grandes, lo que le da el aspecto de esponja. La matriz ósea, o marco, se organiza en una estructura de tres dimensiones, las trabéculas, arreglado a lo largo de líneas de carga. El hueso esponjoso constituye alrededor del 20 por ciento del esqueleto humano, proporciona soporte estructural y flexibilidad. Constituye la mayor parte de los extremos ensanchados (epífisis) de los huesos largos y es el componente principal de las costillas, los omóplatos, los

huesos planos del cráneo y una variedad de huesos cortos de otras partes del esqueleto. La estructura abierta del hueso esponjoso permite amortiguar tensiones repentinas, como en la transmisión de cargas a través de las articulaciones. Proporciones variables de espacio a hueso se encuentran en diferentes huesos de acuerdo con la necesidad de fuerza o flexibilidad [3].

El hueso esponjoso y el compacto son fáciles de diferenciar, incluso a simple vista como se muestra en la figura 1.1

Como elementos del hueso tenemos: lamela intersticial, lamela concéntrica, osteona, lamela circunferencial, periostio, osteocito en laguna, vasos sanguíneos dentro de un canal de Havers y vasos sanguíneos con canal de Volkmann (Fig. 1.1). Las células que están involucradas directamente con el hueso son los osteoclastos, osteoblastos y los osteocitos.

El hueso a estudiar

El hueso estudiado en este trabajo de tesis fue obtenido radio del bovino (Fig. 1.2).

El radio está constituido por: cabeza del radio, faceta articular, cuello del radio, tuberosidad radial, cuerpo del radio, troclea del radio y proceso estiloide medial. En particular, la parte que se trabajo fue el cuerpo del radio [4].

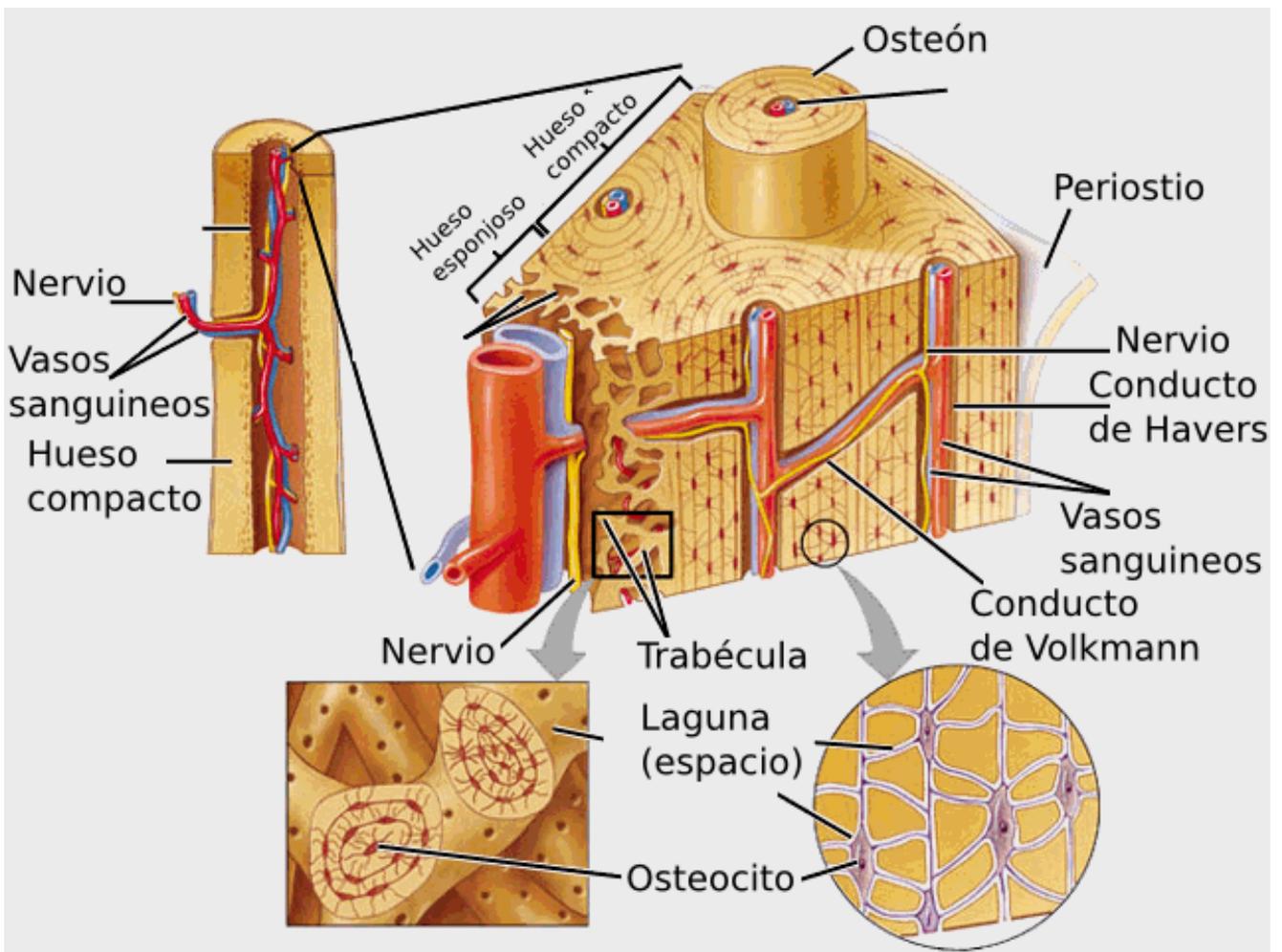


Figura 1.1 Elementos característicos del hueso.

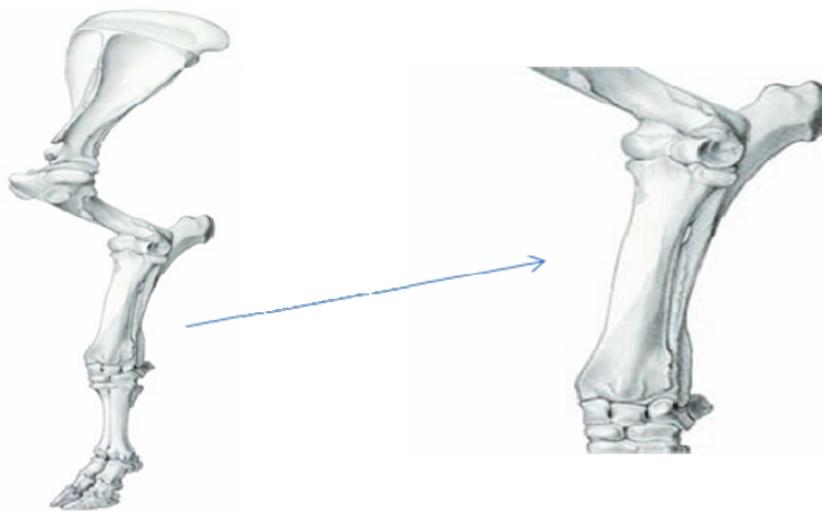


Figura 1.2 Localización y detalle del cuerpo del radio del bovino.

Capítulo 2. Hidroxiapatita

Hidroxiapatita sintética

La hidroxiapatita es la componente principal de la parte inorgánica del hueso. La fórmula de la hidroxiapatita es $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$. La hidroxiapatita sintética tiene una relación Ca/P de 1.667. La figura 2.1 presenta una representación esquemática de la distribución de los átomos dentro de la celda unitaria hexagonal de la hidroxiapatita.

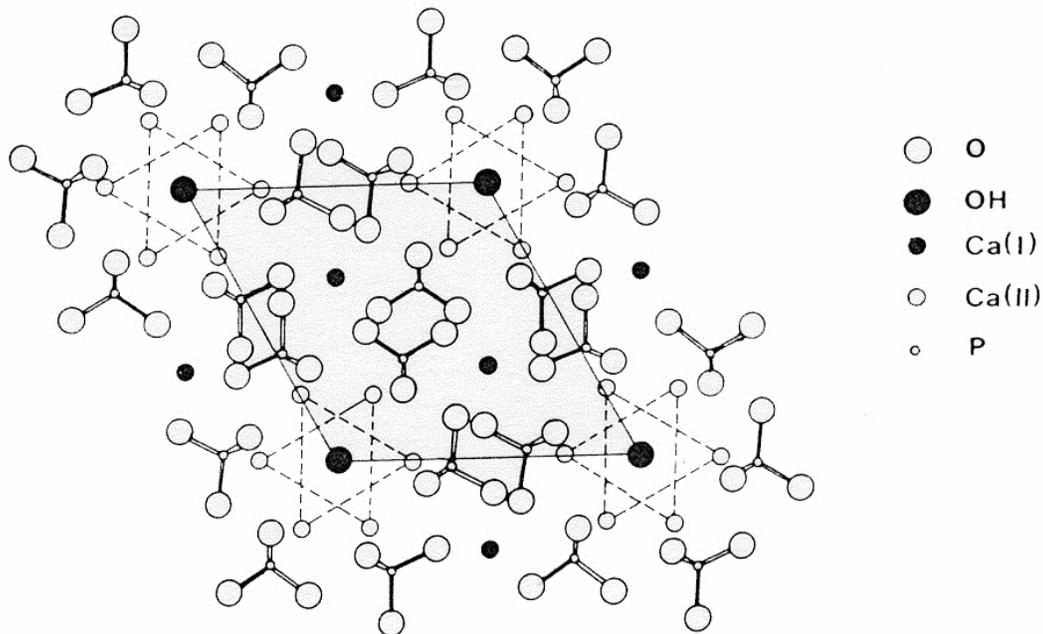


Fig. 2.1. Representación esquemática de las posiciones de los átomos de Ca, P, O y H en la celda unitaria hexagonal de la hidroxiapatita.

La hidroxiapatita en el esmalte, la dentina y el hueso no corresponde con la fórmula $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ya que presenta iones de carbonato CO_3^{2-} ubicados tanto en el tetraedro PO_4^{3-} y en los sitios OH^- , y elementos tales como Mg, Na, C, y Cl se incluyen también en su celda unidad. El contenido de carbonato se ha encontrado para estar en el intervalo de 3,5% en peso en esmalte. En la Tabla 2.1 se presentan los tamaños de cristal típicos reportados en

la literatura para la hidroxiapatita.

Cristalografía

La hidroxiapatita tiene una celda unitaria hexagonal con grupo espacial $P6_3/m$. Los parámetros de la celda son $a=9.43$, $c=6.88$ Å. Sus ángulos $\alpha=90$, $\beta=90$ y $\gamma=90$ [5].

Tabla 2.1 Tamaños de cristal típicos en la hidroxiapatita

| Tamaño de cristal | Condiciones | Tipo | Referencia |
|-----------------------|----------------|--|----------------------------------|
| 17 nm | 80°C | Hidroxiapatita nanométrica sintetizada | R. N. Panda 64(2003) 193-199[26] |
| 80 nm | 800°C | Hidroxiapatita nanométrica sintetizada | R. N. Panda 64(2003) 193-199[27] |
| 50-100 nm 25-50 nm | Largo Ancho | Parte inorgánica del hueso | X. Su Bone 32(2003) 150-162[21] |

Hidroxiapatita biológica

Las apatitas biológicas difieren de la hidroxiapatita en composición, cristalinidad y en otras propiedades físicas y mecánicas. Las apatitas biológicas son usualmente deficientes en calcio, presentando la sustitución del grupo fosfato por grupos carbonatos, por tal razón, también se refiere a ellas como hidroxiapatitas carbonatadas del tipo B. Tiene por fórmula $Ca_{10-x}(PO_4)_{6-x}(CO_3)_x(OH)_{2-x}$ [34].

Usos y aplicaciones

El hueso puede ser utilizado como material para injertos óseos. La hidroxiapatita sintética se utiliza por una buena biocompatibilidad [7]. En particular, la hidroxiapatita preparada a partir de hueso bovino posee una excelente biocompatibilidad [8].

Entre las características más distintivas de los cristales de hidroxiapatita están su tamaño y su cristalografía [9]. Existen otros usos de la hidroxiapatita, por ejemplo en arqueología, donde se analizan los restos animales y humanos para conocer hábitos alimenticios [10].

Capítulo 3. Granulometría

El concepto de granulometría y las técnicas existentes de medida son un punto importante en el desarrollo del presente trabajo de tesis por la relación que guarda con el concepto de índice de cristalinidad. Aquí haremos una revisión de este tema.

El concepto de granulometría

La granulometría, también conocida como análisis granulométrico, es el conjunto de procedimientos para determinar el tamaño de grano de rocas sueltas, arcillas y materiales artificiales [11].

Estas partículas se dividen en base al tamaño en complejos definidos o fracciones. La separación de los materiales de grano grueso se realiza por medio de una serie de redes (Tamices). La separación de las fracciones de arena (partículas con dimensiones de centésimas de milímetro a 2-3 mm) se realiza por tamizado (con o sin lavado) a través de una serie de tamices con aberturas apropiadas (el llamado análisis de tamiz). La separación de las partículas más pequeñas se realiza por métodos hidráulicos ya sea a base de la diferencia en la velocidad de sedimentación de las partículas de diferentes tamaños en agua tranquila o en la capacidad de chorros de agua fluyendo a diferentes velocidades. Hay también otros métodos, como el análisis por dispersión y análisis por sedimentación. La precisión de estos métodos no es más que 1 por ciento. En gran medida, los resultados dependen del método de preparación de la mezcla para su análisis.

Los resultados del análisis se representan gráficamente o en forma de Tablas numéricas[11]. Los cuadros más comunes son histogramas, curvas de frecuencia acumuladas y curvas de distribución.

Técnicas para la Medida de la granulometría

Medida del tamaño de cristal mediante la difracción de rayos x

La ecuación de Scherrer de rayos X es utilizada para estimar el tamaño de los cristales a partir de un perfil de picos de difracción [12].

$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

El valor de τ representa el tamaño medio de los dominios cristalinos que puede ser **menor o igual al tamaño de grano**. El factor adimensional K está relacionado con la geometría del cristal y tiene un valor típico de 0.9 para un cristal considerado esférico. La ecuación de Scherrer está limitada a partículas de tamaño nanométrico

Medida del tamaño de cristal mediante TEM

El tamaño de grano puede obtenerse de forma directa por TEM a través del uso de imágenes de campo claro. El tamaño de cristal se obtiene directamente de las imágenes de campo oscuro.

Existe software como por ejemplo el Programa Digital Micrograph en donde se mide el tamaño de grano tanto por área como por perímetro y diámetro a partir de las imágenes de SEM y TEM. Para hacer la granulometría por TEM se procesaron las imágenes pues contenían ruido. Primero se aplica un filtro de mediana para eliminar algo de ruido en la imagen.

Capítulo 4. El índice de cristalinidad

El concepto de cristalinidad y las técnicas de medición juegan un papel importante en el presente trabajo de tesis. Por lo tanto, aquí presentamos este concepto y las técnicas de medida por difracción de rayos X y por espectroscopía infrarroja.

Concepto de cristalinidad

La cristalinidad se refiere al grado de orden estructural en un sólido. En un cristal, los átomos o moléculas están arreglados de manera periódica. El grado de cristalinidad tiene una gran influencia sobre la dureza, la densidad, la transparencia y difusión.

Muchos materiales, pueden ser preparados de tal manera que se produzca una mezcla de regiones amorfas y cristalinas. En tales casos, la cristalinidad usualmente se especifica como un porcentaje del volumen del material que es cristalino. Incluso dentro de los materiales que son completamente cristalinos, sin embargo, el grado de perfección estructural puede variar. La mayoría de las aleaciones metálicas son cristalinas, pero usualmente comprenden muchas regiones cristalinas independientes (granos o cristalitas) en varias orientaciones separadas por fronteras de grano; además, contienen otros defectos (notablemente dislocaciones) que reduce el grado de perfección estructural. Los cristales más perfectos son las obleas de silicio producidas para semiconductores. [13]

El concepto de cristalinidad en la materia, aunque aparentemente bien definido como la fracción de volumen cristalino de una fase en una muestra, aun se debate principalmente cuando se trata de cantidades muy pequeñas de material [14].

Medida del índice de cristalinidad

Se sabe que la componente mineral del hueso tiene características bien definidas en relación con la función del hueso y la edad: en particular el grado de cristalinidad y el tamaño

de cristal se relacionan con una etapa osteogénica específica y finalmente con el rendimiento biomecánico del hueso [14].

Para dar una medida acerca del grado de cristalinidad de las muestras empleadas usaremos el índice de cristalinidad medido usando FTIR y DRx.

Índice de cristalinidad medido por DRx

Entre la literatura existen varios artículos que definen el índice de cristalinidad medido por DRx. En general lo que se hace es medir la intensidad de dos o tres reflexiones asociadas a la parte no orgánica del hueso y comparar (división matemática) con respecto a la reflexión más intensa. De esta forma el índice de cristalinidad se expresará de la siguiente manera:

$$IC = \frac{\Sigma (a(112), b(300), c(202))}{h(211)} = (a + b + c) / h$$

Entonces, cuanto más elevado sea este índice mayor será la cristalinidad [9].

Por lo tanto, el objetivo es distinguir la separación de los picos correspondientes a reflexiones [211], [112], [300] y [202]. La altura se mide entre el valor promedio en la cima de un pico y el valor del “valle” que le separa del siguiente pico. Estos valores divididos por la altura del pico más alto [211], restando el valor de la línea de base tomado entre 24° y 38° 2θ, con la radiación Kα del cobre, dan el valor del índice de cristalinidad CI:

$$CI = \frac{\Sigma H(202), H(300), H(112)}{H(211)} = a + b + c / h \quad [9]$$

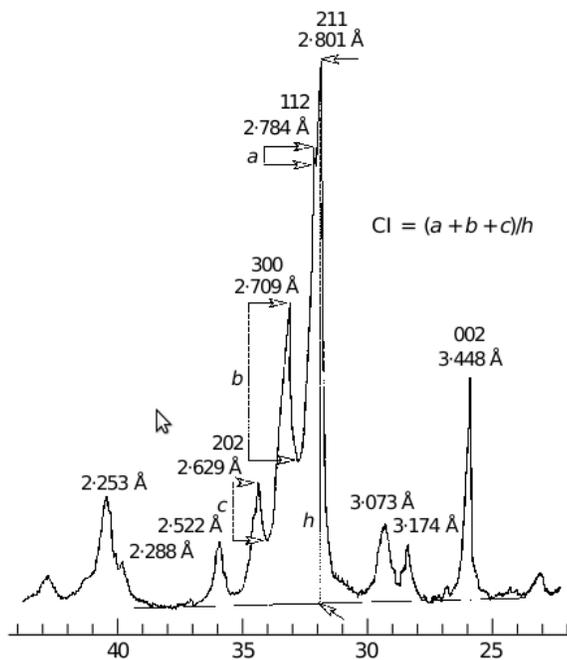


Fig. 4.1. Identificación de los picos característicos del difractograma de rayos X para la medida del índice de cristalinidad [9].

Índice de cristalinidad medido por FTIR

El índice de cristalinidad también puede ser medido utilizando FTIR, para lo cual existen dos vertientes: utilizar áreas o bien utilizar –de manera similar a como se hizo por el método de DRx- la altura de los picos (usualmente los relacionados con los grupos fosfatos) y dividirlos entre el pico más alto. En la literatura encontramos algunos ejemplos para definir el índice de cristalinidad por FTIR, por ejemplo:

- El índice de cristalinidad (CI) mide el grado de separación de la banda PO_4^{3-} y puede ser definido por

$$CI = (A_{605} + A_{565}) / A_{595}$$

Donde A_x es la absorbancia en el número de onda x , asumiendo una línea de base recta entre 750 y 450 cm^{-1} (Weiner y Bar Yosef, 1990) [16]

- Termine y Posner definen un parámetro geométrico para relacionar el índice de cristalinidad con la fracción A_1/A_2 esquematizados en la figura 4.2.

A_1 se construye con la curva de los picos de transmisión y una línea que conecta los puntos de transmisión mínima. Para A_2 se dibuja una línea base de los 450 cm^{-1} a los 700 cm^{-1} en el punto más alto de la banda de absorción.[17]

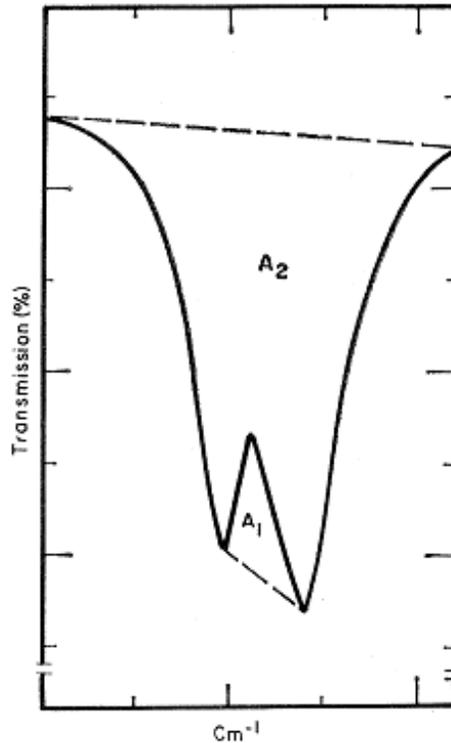


Fig. 4.2. Identificación de los picos característicos del espectro de FTIR para la medida del índice de cristalinidad [17].

- Un estimado del contenido de carbono esta dado por la razón de absorción de el pico de carbonato al pico de fosfato [18]
- El índice de cristalinidad (CI) se puede calcular como la razón entre las áreas del pico localizado en 1030 cm^{-1} (apatita altamente cristalina) y el pico ubicado en 1010 cm^{-1} (apatita con baja cristalinidad) [19]

$$CI = A_{1030}/A_{1010}$$

Capítulo 5. Técnicas de observación y análisis

Las técnicas utilizadas en el presente trabajo de tesis fueron la microscopía óptica, la microscopía electrónica de barrido, la microscopía electrónica de transmisión, la difracción de Rayos X y la espectroscopía infrarroja. Aquí presentamos las generalidades de estas técnicas.

Microscopía Óptica

El microscopio óptico usa luz visible y un sistema de lentes para magnificar las imágenes. Son el diseño más antiguo. Tiene dos configuraciones básicas: lente sencilla y lente compuesta. La gran mayoría de los microscopios para investigación modernos son microscopios compuestos. En general, la óptica de los microscopios es estática. Para enfocar a diferentes distancias focales se ajusta la distancia a la muestra, y para obtener un campo de visión más amplio o más corto un objetivo de diferente magnificación debe usarse. La mayoría de los microscopios de investigación modernos cuentan con un conjunto óptico separado para iluminar la muestra. Los microscopios también cuentan con una construcción a la que se pueden adaptar cámaras fotográficas o de video para registrar las micrografías.

Para este trabajo se utilizaron los microscopios electrónicos de la marca Zeiss modelos Stemi 2000-C y Axiovert 125 mostrados en la figura 5.1.

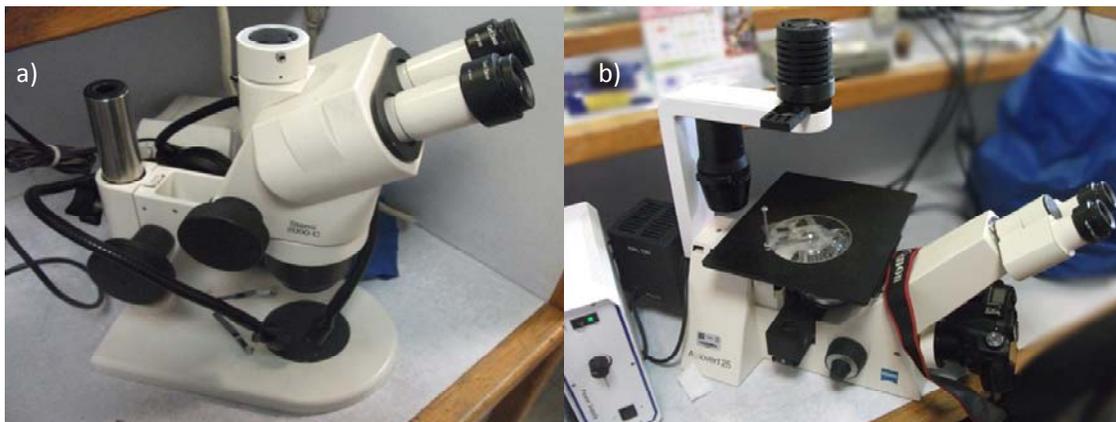


Figura 5.1 Microscopios ópticos a) Zeiss Stemi 2000-C y b) Zeiss Axiovert 25

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Un microscopio de SEM (Scanning Electron Microscope) es un microscopio electrónico que produce imágenes de una muestra escaneándola con un haz de electrones enfocados. Los electrones interactúan con los electrones de la muestra, produciendo varias señales que pueden ser detectadas y contienen información sobre la topografía de la muestra y de la composición. Los especímenes pueden ser observados en alto vacío y bajo vacío

El SEM proporciona varios tipos de señales como son los electrones secundarios, los cuales dan una imagen de la morfología superficial de la muestra. También tenemos los electrones retrodispersados, mediante los cuales obtenemos una imagen cualitativa de zonas con distinto número atómico medio (es decir composición química distinta), y la señal de rayos X (EDS).

Para este trabajo se usó el microscopio electrónico de barrido Jeol 5600 LV que se muestra en la figura 5.2.



Figura 5.2 Microscopio electrónico de barrido Jeol 5600 LV.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía por transmisión de electrones utiliza una muestra delgada, generalmente en polvo, a través de la cual pasa un haz colimado de electrones de alta energía. Una serie de lentes electromagnéticas modifican la forma del haz hasta que pasa a través de la muestra donde llega ya amplificado a un detector, entonces puede fotografiarse o registrarse por medio de un CCD. En este caso usaremos imágenes de campo claro y de campo oscuro para medir el tamaño de grano y el tamaño de cristal del hueso bovino.

La imagen de campo claro se obtiene seleccionando el haz más intenso del patrón de difracción (el haz transmitido) con la apertura objetiva del microscopio para formar la imagen. La imagen de campo oscuro se obtiene seleccionando uno de los haces difractados. Para este trabajo se utilizarán los microscopios JEOL 4000 EX y JEOL 2010 FEG mostrados en la figura 5.3.

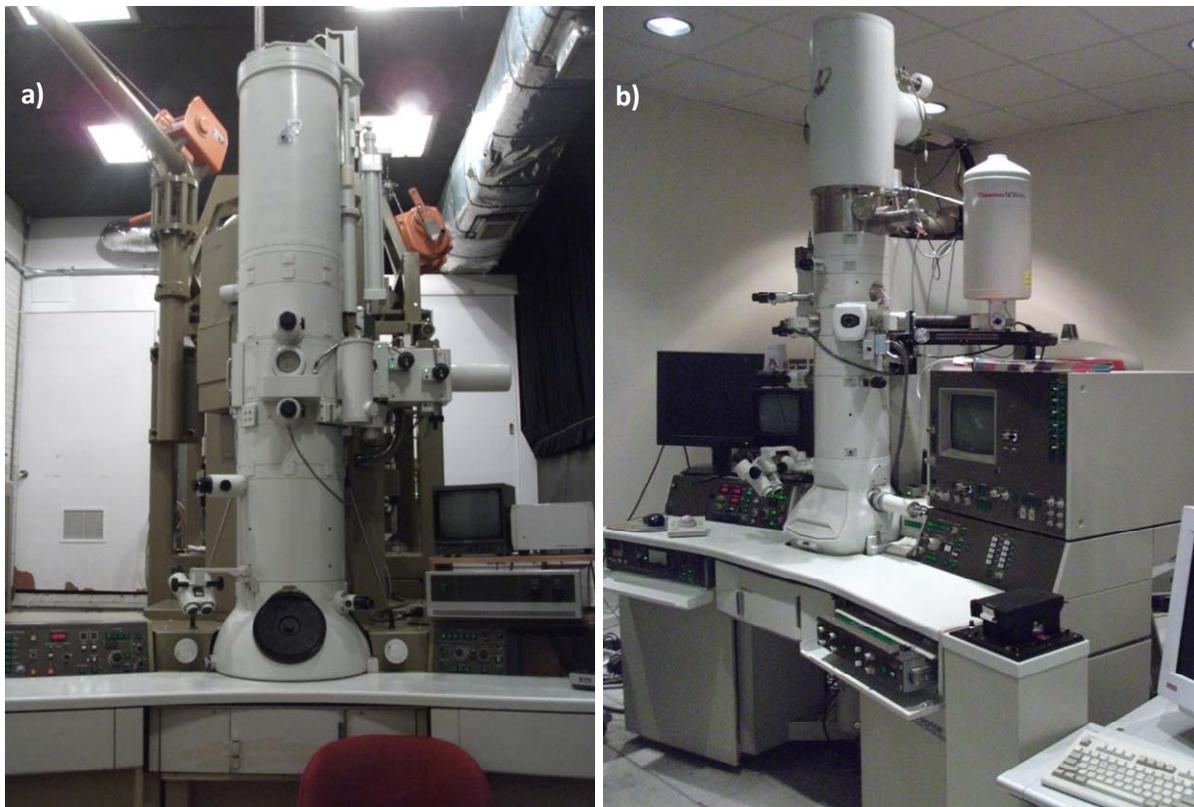


Figura 5.3 Microscopios de transmisión a) JEOL 4000 EX y b) JEOL 2010 FEG.

Difracción de Rayos X (DRx)

Los rayos X son ondas electromagnéticas en el rango de 0.01 a 1 nm, tienen suficiente energía para atravesar sólidos lo suficientemente delgados. Para crear estos rayos lo que se hace es crear un haz de electrones de alta energía y detenerlos abruptamente al hacerlos impactar contra un objetivo de metal. Entonces esos electrones emitirán todo o parte de su energía en forma de rayos x, a esto se le conoce como brehmsstrahlung. La energía cinética de los electrones se convierte principalmente en calor, pero un pequeño porcentaje deja el metal como fotones de rayos X. Estos fotones tienen un rango continuo de longitudes de onda, con unos cuantos picos de alta intensidad característica. Entre más alto el voltaje de aceleración, más grande el rango de longitudes de onda de la fuente de rayos x.

Cuando iluminamos un cristal con un haz de rayos x se forma un patrón de difracción. A partir de las posiciones de los haces difractados se puede deducir la información acerca del tamaño y la forma de la celda unitaria. A partir de las intensidades relativas de los haces difractados se puede deducir la información acerca de las posiciones de los átomos dentro de la celda unitaria [21]

Para este trabajo se utilizó el difractómetro de rayos x de la marca Bruker modelo Advanced D8 mostrado en la figura 5.4.



Figura 5.4 Difractómetro de rayos X Bruker Advanced D8.

Espectroscopía infrarroja (FTIR)

La espectroscopia de Fourier es un término general que describe en análisis de cualquier señal variante en sus componentes de frecuencia. Las transformadas de Fourier pueden ser aplicadas a una variedad de espectroscopias incluyendo la espectroscopia infrarroja conocida como Fourier Transform Infrared. La espectroscopia FTIR incluye la absorción, reflexión, emisión o espectro foto-acústico. El poder del método reside en análisis simultáneo de muchas frecuencias componentes en una sola operación. El espectrómetro de FTIR da el espectro entero en el tiempo que un espectrómetro convencional requeriría para escanear una sola línea del espectro.

El objetivo de las técnicas de absorción (incluyendo al FTIR) es medir cuanta luz absorbe una muestra a una determinada longitud de onda. En el caso del FTIR en lugar de aplicar una fuente monocromática se aplica una fuente con muchas frecuencias a la vez.

Para este trabajo se uso el espectrómetro de infrarrojo de la marca Thermo Scientific modelo Nicolet 6700 FTIR mostrado en la figura 5.5.



Figura 5.5 Espectrómetro de infrarrojo Thermo Scientific modelo Nicolet 6700 FTIR

Refinamiento Rietveld

El método de Rietveld es una técnica de refinamiento de estructuras cristalinas que fue diseñado originalmente para analizar patrones de difracción de neutrones y posteriormente se ha utilizado en patrones de difracción de rayos X. Este método consiste en ajustar un modelo teórico a un patrón experimental de difracción de rayos x, utilizando el método de mínimos cuadrados, hasta obtener el mejor ajuste entre ambos. El patrón de difracción

calculado se basa en un modelo que incluye aspectos estructurales (grupo espacial, átomos en la celda unitaria, factores de temperatura, etc), microestructurales (concentración, tamaño de cristal, microdeformaciones), e instrumentales (óptica del equipo de difracción de rayos X, anchura de las rejillas (slits) utilizadas en la medición, tamaño de la muestra irradiada, penetración del haz de rayos-X en la muestra, etc.). [12]

La técnica de Rietveld consiste básicamente en minimizar por mínimos cuadrados la función S:

$$S = \sum w_i (y_i - y_{ci})^2 = \text{mínimo}$$

en donde

w_i = es el peso de cada punto de observación

y_i es la intensidad del difractograma de polvos medida en el punto i ; i normalmente representa a un ángulo de difracción, una distancia o una energía,

y_{ci} es la intensidad calculada en el punto i .

La suma es sobre todos los puntos para los que se ha medido el difractograma.

El difractograma experimental se mide a intervalos iguales entre puntos, desde un valor inicial (que se recomienda sea menor que aquel en el que aparece el primer pico de difracción) hasta un punto final tan grande como el arreglo experimental lo permita.

Como la función que se minimiza es S con ella se genera el residuo [12]

$$R_{WP} = \sqrt{\frac{S_y}{(\sum w_i y_i^2)}}$$

cuyo valor se emplea como criterio para determinar que tan bueno es el ajuste entre los difractogramas experimental y teórico. Para que el valor de este residuo sea pequeño se requiere que todas las partes que contribuyen al difractograma sean modeladas correctamente.

En el caso de la difracción de rayos X, las colas de los picos de difracción no son descritas correctamente con un perfil Gaussiano, ni aun con un perfil Lorentziano; el mejor resultado se obtiene empleando una función de Voigt. Para hacer cálculos la función de Voigt se aproxima con una combinación lineal de una función Gaussiana y una Lorentziana de acuerdo a la siguiente ecuación conocida como función de pseudo-Voigt.

$$SV = \eta L + (1-\eta)G$$

en donde L representa una función Lorentziana, y G representa una función Gaussiana.

El tamaño de cristal se puede notar en el ensanchamiento de línea y puede ser reconocido fácilmente en las gráficas de diferencia $y_i(obs) - y_i(calc)$. Produce contribuciones intrínsecas al perfil de Lorentz. Los microesfuerzos por otro lado producen perfiles de forma gaussiana, y una vez más esto puede ser reconocido en las gráficas de diferencia de $y_i(obs) - y_i(calc)$ [12]

Los materiales policristalinos invariablemente contienen imperfecciones que modifican la intensidad de las reflexiones de Bragg, y más seriamente también la forma del pico. Esta separación de la estructura ideal es conocida como la microestructura. Las desviaciones principales observadas en los perfiles vienen de pequeñas partículas y de esfuerzos y deformaciones en la muestra. Dado que un patrón de difracción de polvo contiene la información completa acerca de la muestra: estructura, cristalinidad, esfuerzo, deformación y demás, es posible estudiar los efectos a partir de los datos de difracción del polvo. Como regla general la contribución del tamaño de cristal es aproximado por una función lorenziana con un ancho proporcional a $1/\cos\theta$. El ensanchamiento debido a la deformación se cubre con una gaussiana, que tiene un ancho proporcional a $\tan\theta$. [12]

La microestructura afecta el ancho y la forma del perfil de difracción. Puede también introducir un desplazamiento de su posición ideal. El ancho de línea y el desplazamiento tienen que tomarse en cuenta para un análisis exitoso. Esto requiere ajustes extensos de perfil, que, si se toman adecuadamente, darán la información buscada. La determinación del tamaño de partícula se trata con la llamada ecuación de Scherrer [12]

$$D_{scherrer} = K\lambda / \beta\cos\theta$$

Con β el ancho integral del perfil, K una constante, por ejemplo K=0.9 para cristales de forma cúbica.

Para el refinamiento Rietveld se utilizó el programa Topas

Capítulo 6. Metodología

En esta sección describiremos la adquisición de la muestra así como el proceso seguido para observarla por microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión así como para la obtención de los espectros de rayos x y de espectroscopía infrarroja.

Preparación de la muestra

El hueso en estudio se muestra en la figura 6.1. Al hueso le fue removida manualmente la médula ósea. Después se hirvió en 13 ocasiones, renovando el agua en cada repetición hasta que no se observaron cambios en el agua retirada (el objetivo de hervir la muestra fue el de remover las sustancias orgánicas y el colágeno [23],[24]), hasta lograr la muestra denominada H13.



Fig. 6.1 Vistas superior y laterales del hueso en estudio. En el fondo se presenta un papel milimétrico, lo que permite obtener la escala del hueso.

Se cortaron arandelas de medio centímetro de espesor usando una segueta de arco. El corte se muestra en la figura 6.2.



Fig. 6.2. La arandela. Corte del hueso con medio centímetro de espesor aproximadamente.

De estas arandelas se preparan dos tipos de muestras: las que serían pulidas para microscopía óptica y posteriormente para SEM y las que serían preparadas como polvo para observación en TEM, FTIR y DRx.

Preparación de muestras para microscopía óptica.

Las muestras se pulieron con lija progresivamente más fina desde la No. 400 hasta la No. 1200 verificando en cada paso con el microscopio óptico para saber que la técnica de pulido era la adecuada. Después se pulió con alúmina y posteriormente se realizó un ataque químico con ácido ortofosfórico para revelar la superficie. Durante este proceso se obtienen las observaciones por microscopía óptica.

Preparación de muestras para SEM

Se retoman las muestras empleadas en microscopía óptica y se procede a depositar una película de carbón sobre la muestra para poder ser observada en SEM.

Preparación de muestras para DRx, TEM y FTIR

Preparación de las muestras para su estudio por DRx, TEM y FTIR consistió en hacerlas polvo. Las muestras se rompieron en un contenedor de acero y posteriormente se molieron en mortero de ágata hasta que se obtuvo la cantidad de polvo requerido para las técnicas utilizadas. De aquí obtenemos las muestras llamadas H13y HS1. Estas muestras fueron entonces usadas en FTIR, DRx y TEM.

De la muestra H13 se procedió al calentamiento. Se calentó una parte de la muestra en polvo H13 a 3°C/min hasta 600° seguido por 5°C/min hasta 750°C durante 4 horas para remover los compuestos orgánicos esto nos da una muestra que llamaremos HS1 [25].

En la figura 6.3 se presenta en resumen el proceso de preparación de las muestras partiendo desde la muestra en bulto hasta su observación y análisis por MO, SEM, TEM, FTIR y DRx.

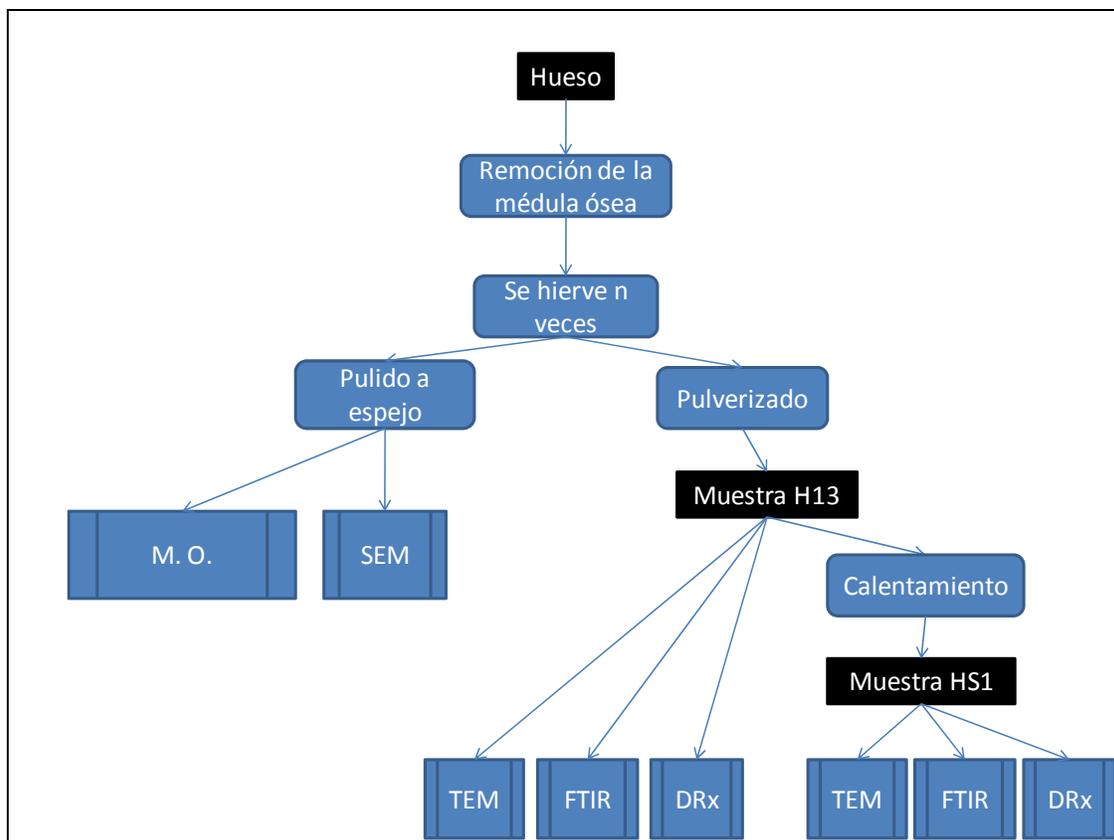


Fig. 6.3 Diagrama del proceso de preparación de muestras

Capítulo 7. Presentación de resultados

La muestra se dividió en 4 secciones para poder observar cada una de las cuatro caras distintas como se muestra en la figura 7.1 y obtener un panorama global de la estructura del hueso bovino.

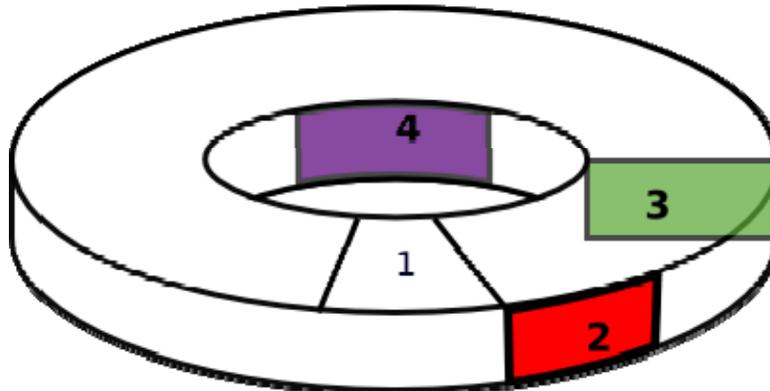


Fig. 7.1 Esquema de la arandela mostrada en la figura 6.2 donde se muestran las superficies observadas tanto en microscopía óptica como en SEM.

1. Cara correspondiente al corte transversal del hueso.
2. Cara exterior del hueso.
3. Corte longitudinal del hueso.
4. Cara interior del hueso.

Cabe hacer notar que las caras 1, 2 y 3 son mutuamente perpendiculares y las caras 2 y 4 son paralelas.

Microscopía Óptica

Las imágenes de M.O. nos permitieron hacer una primera aproximación al estudio de la estructura del hueso. La Fig. 7.2 presenta la imagen de M.O. del hueso vista en la cara 1. Aquí se observan algunos canales de Volkmann mientras que la Fig. 7.3 presenta la imagen de MO del hueso vista en la cara 2. Se observa la estructura laminar del hueso y algunas

lagunas. Por otro lado Fig. 7.4 presenta la imagen de MO del hueso vista en la cara 3. Aquí se observan los conjuntos Havers la estructura de las lamelas concéntricas del hueso y algunas lagunas. La Fig. 7.5 presenta la imagen de MO del hueso vista en la cara 4. Se observan los canales de Volkmann y la estructura laminar del hueso.

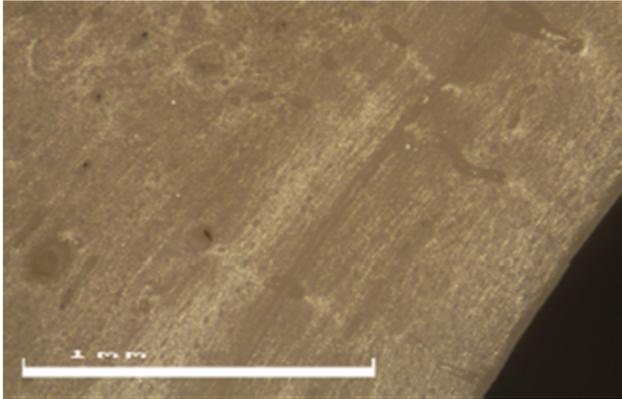


Fig. 7.2 Imagen de MO del hueso vista en la cara 1. Objetivo 5x con adaptador 2.5x. Se observan algunos canales de Volkmann.

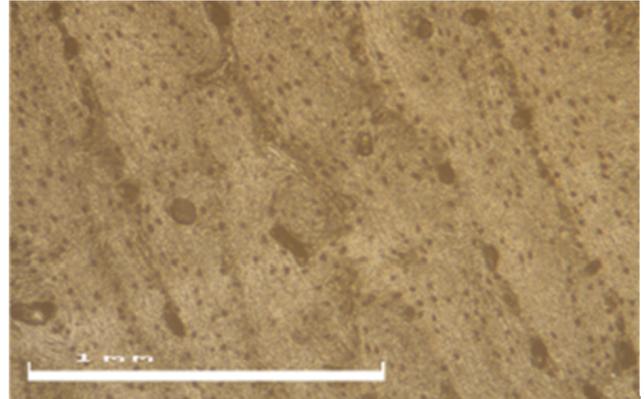


Fig. 7.3 Imagen de MO del hueso vista en la cara 2. Objetivo 5x con adaptador 2.5x. Se observa la estructura laminar del hueso y algunas lagunas

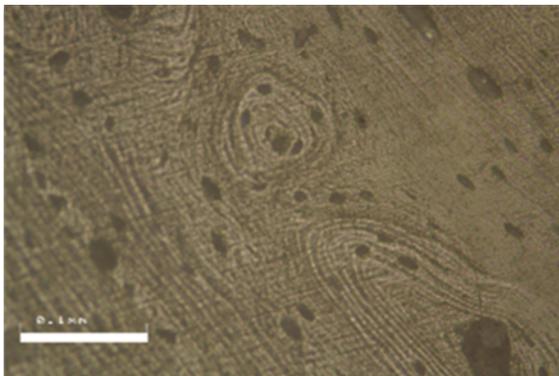


Fig. 7.4 Imagen de MO del hueso vista en la cara 3. Objetivo 20x con adaptador 2.5x. Se observan los conjuntos Havers la estructura de las lamelas concéntricas del hueso y algunas lagunas.

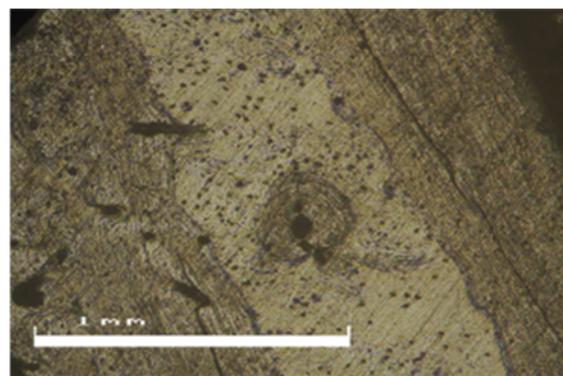


Fig. 7.5 Imagen de MO del hueso vista en la cara 4. Objetivo 5x con adaptador 2.5x. Se observan los canales de Volkmann y la estructura laminar del hueso.

Resultados de SEM

El SEM nos permitió analizar las estructuras observadas con el MO a un mayor detalle. De manera general se tomaron imágenes en el modo de electrones secundarios y electrones retrodispersados. Cabe recordar que las imágenes de SEM en el modo de electrones secundarios nos dan información de la topografía de la muestra, mientras que las imágenes de electrones retrodispersados indican, en la mayoría de las veces, información química, pero sin especificar el elemento químico en particular.

La Figura 7.6 a) presenta la imagen de electrones secundarios de la cara 1 tal y como se indica en la figura 5.1 mostrando las osteonas, también conocido como sistema de Havers. La figura 7.6 b) presenta la misma región que la figura 7.6 a) pero en el modo de electrones retrodispersados. El contraste claro observado en la figura 7.6 b) presentaba disminución cuando se disminuía el voltaje, dando indicación que se trata de un efecto de borde más que una diferencia de composición química. La Figura 7.6 c) presenta las imágenes de electrones secundarios de la cara 1 mostrando un Canal de Volkmann y las lagunas. La Figura 7.8 presenta la imagen de SEM de electrones secundarios y electrones retrodispersados de la cara 2. Nuevamente el contraste claro observado en (B) presentaba disminución cuando se disminuía el voltaje, dando indicación que se trata de un efecto de borde más que una diferencia de composición química. La Figura 7.8 corresponde nuevamente a la cara 2, donde se observa claramente un canal de Volkmann. El contraste claro observado se trata de un efecto de borde más que una diferencia de composición química. Las Figura 7.8 presentan el caso para la cara 3. Se observa claramente las y las lagunas hueso. El contraste claro es nuevamente un efecto de borde. La Figura 7.8 b) es una amplificación de la imagen del SEM de la cara 3 donde se observa claramente las y las lagunas hueso. Las Figura 7.9 presenta el caso para las imágenes de SEM de electrones secundarios de la cara 4. Se observa claramente la estructura lamelar del hueso así como los canales de Volkmann y las lagunas del hueso.

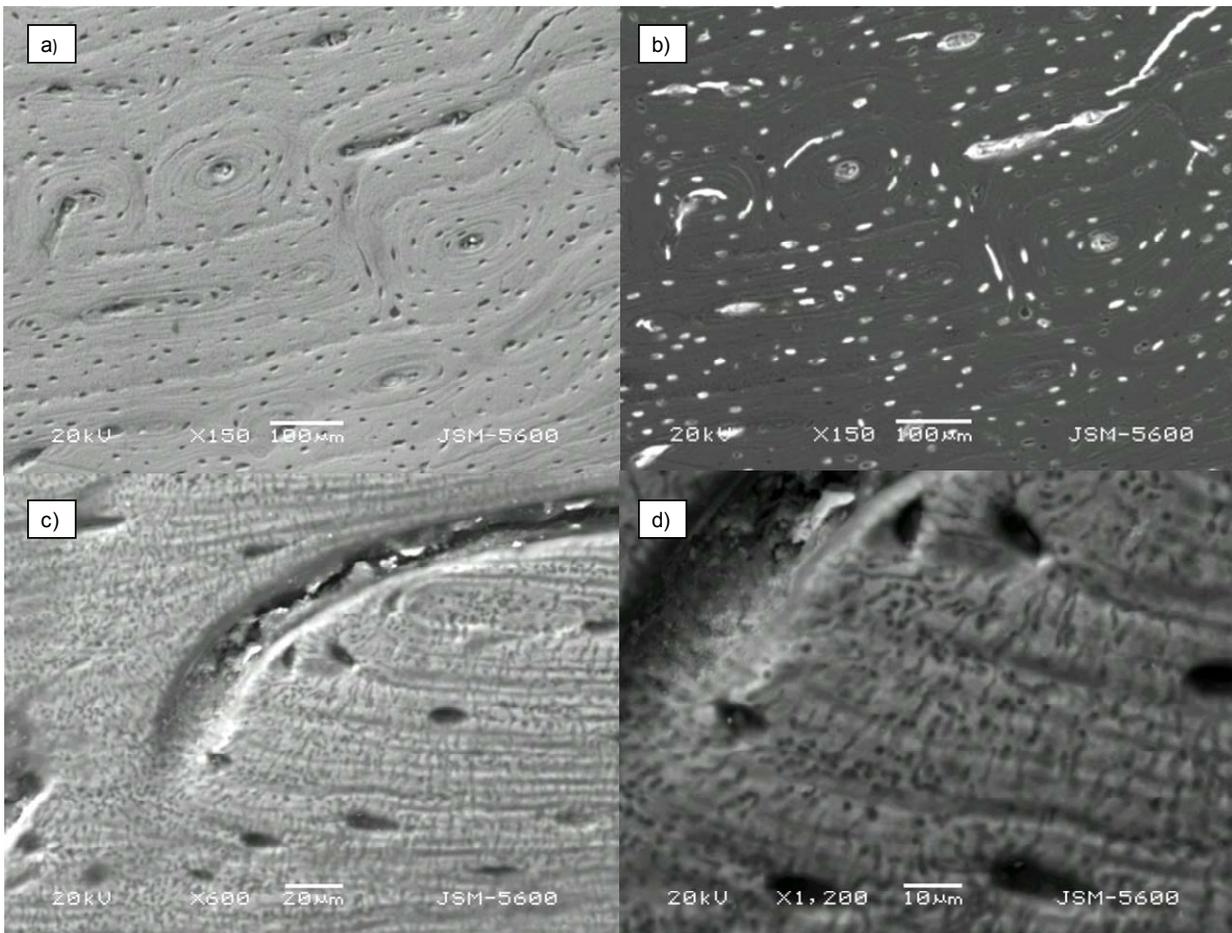


Figura 7.6 Imágenes de electrones secundarios de la cara 1 mostrada en la figura 7.1 mostrando a) Las osteonas, también conocido como sistema de Havers, c) Canal de Volkmann y d) Canal de Volkmann y las lagunas. b) Imagen de la misma región que a) en electrones retrodispersados.

Resultados de EDS

La variación en composición química se estudió por EDS. Los elementos esperados son aquellos componentes de la hidroxiapatita: Ca, P y O. El hidrógeno no puede ser detectado por esta técnica. Realmente se obtuvieron pocas variaciones en los elementos y concentraciones de estos elementos. La mayor variación se observó en los elementos minoritarios, principalmente.

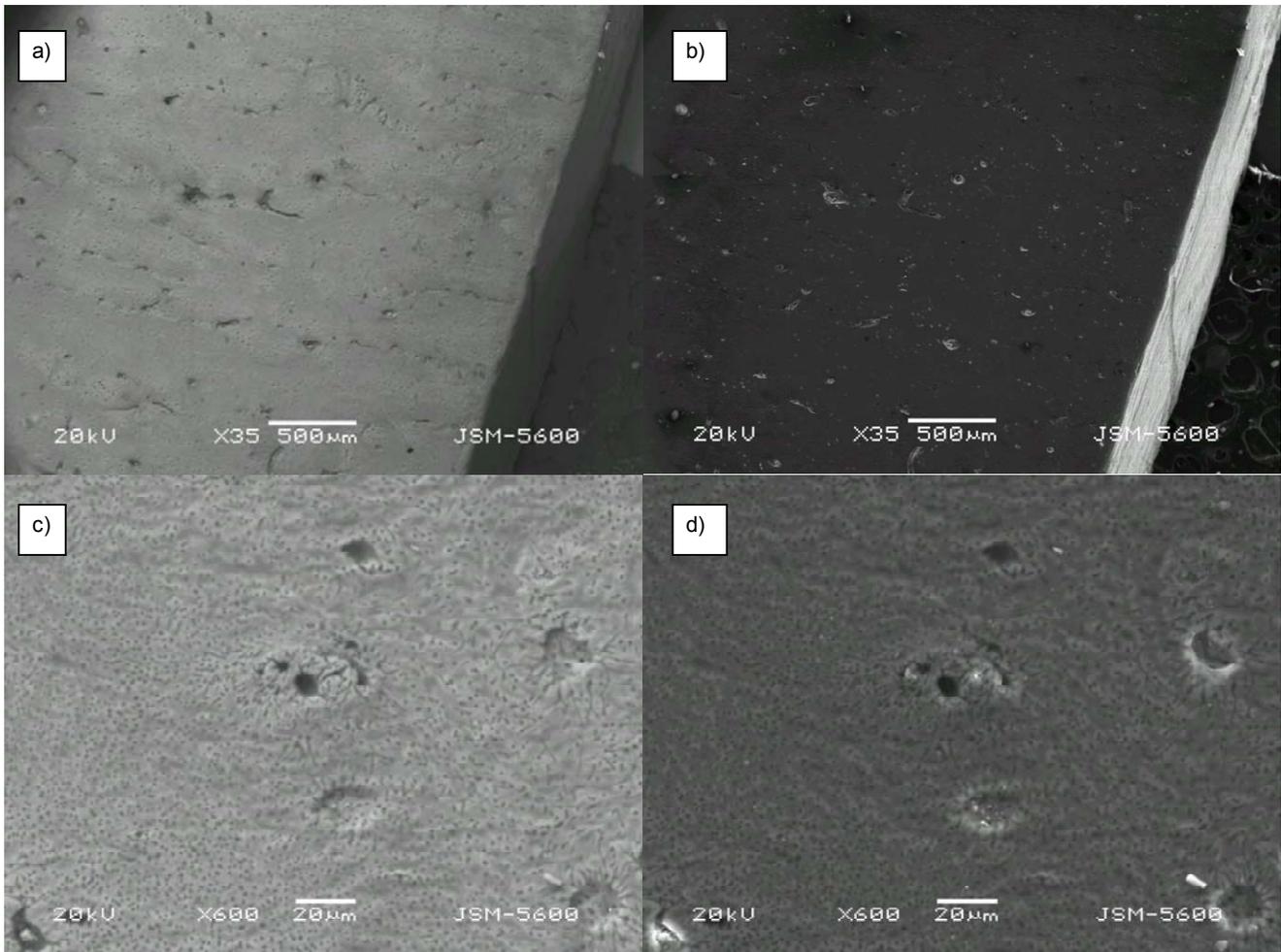


Figura 7.7 a) y c) Imágenes de SEM de electrones secundarios de la cara 2 mostrada en la figura 7.1. b) y d) Imágenes de SEM de electrones retrodispersados de la cara 2 de la figura 7.1.

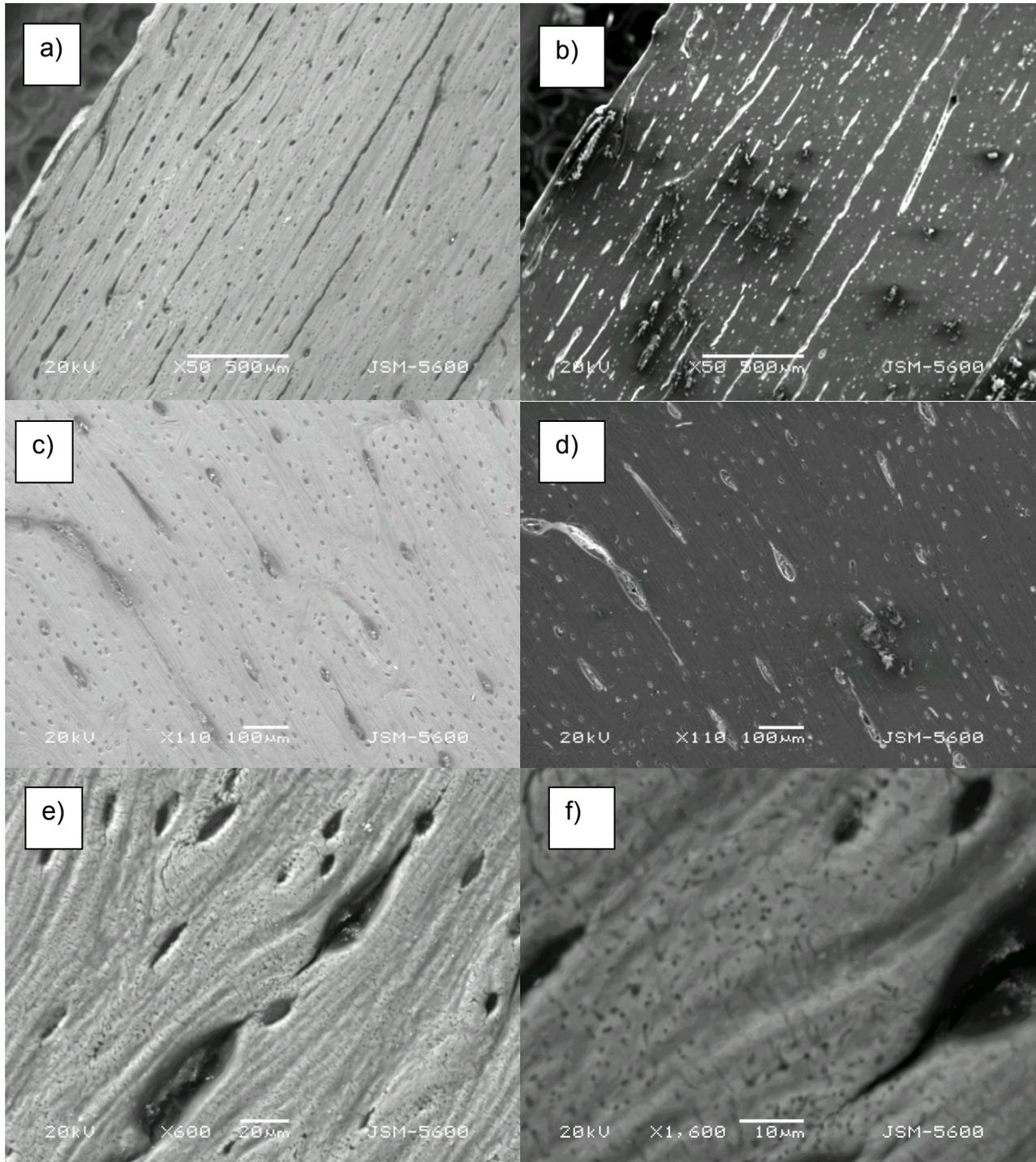


Figura 7.8 Imágenes de SEM de electrones secundarios (a, c, e y f) y electrones retrodispersados (b,d y f) de la cara 3 mostrada en la figura 7.1. Se observan las lagunas del hueso.

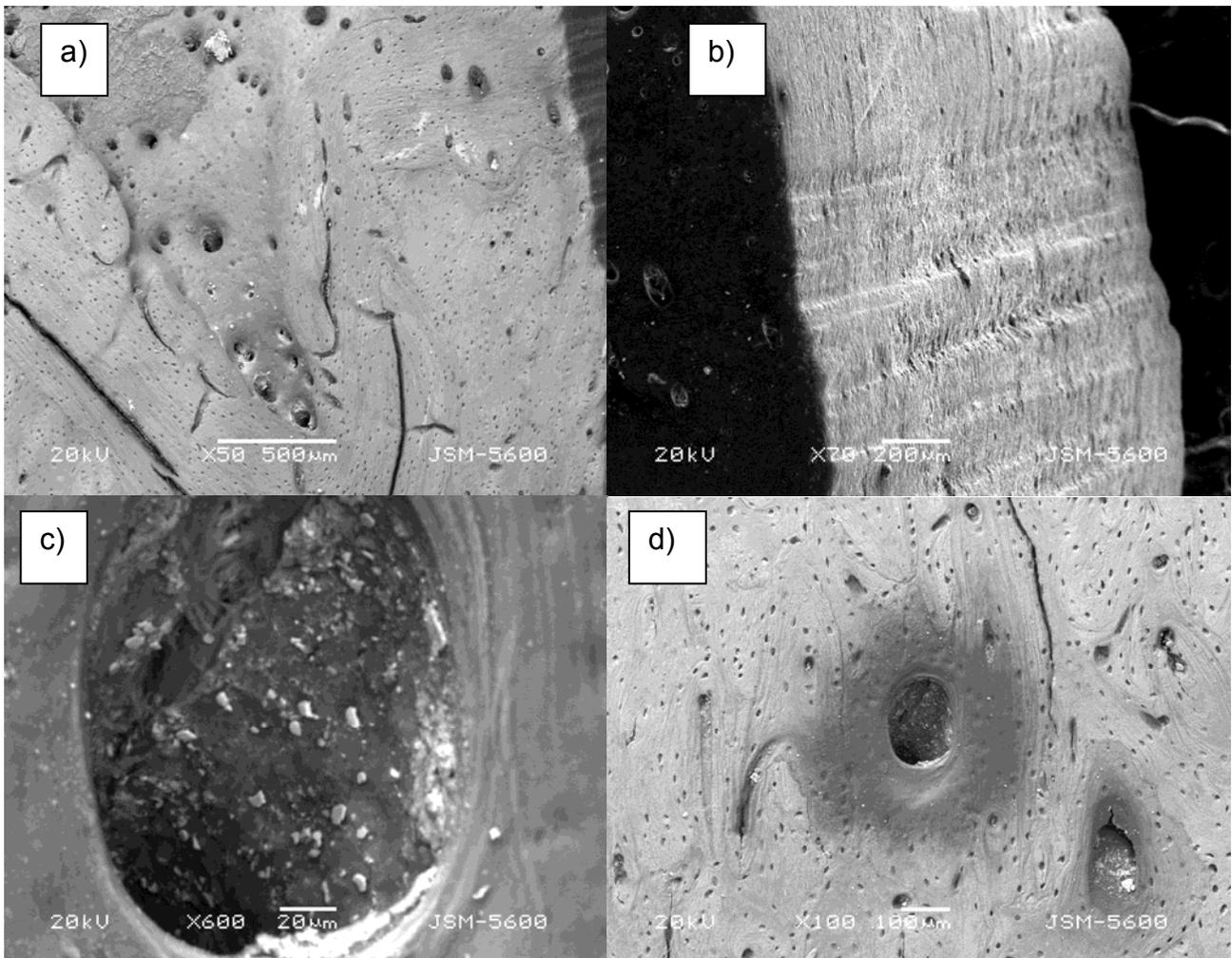
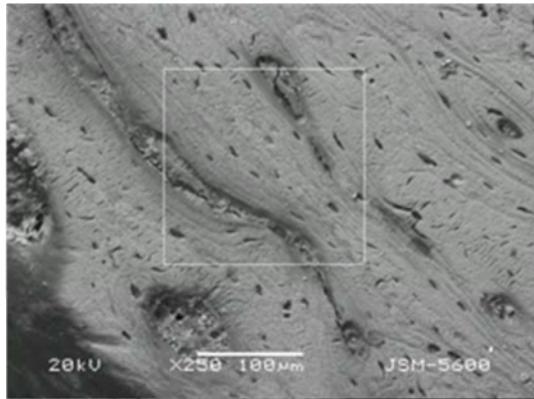


Figura 7.9 Imágenes de SEM de electrones secundarios de la cara 4 mostrada en la figura 7.1. Se observa la estructura lamelar del hueso así como los canales de Volkmann y los lagunas del hueso.

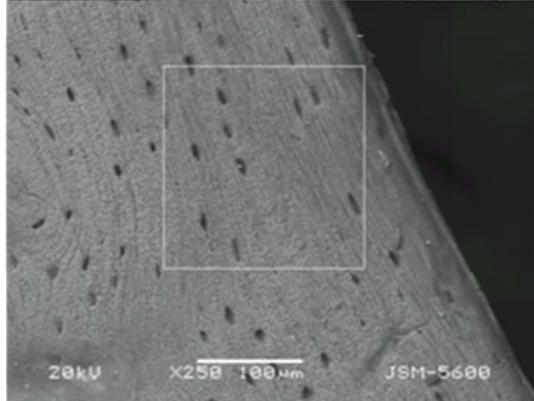
La Figura. 7.10 presenta el caso de los espectros de EDS de la cara 1 pero en diferentes regiones: la región exterior, la región media y la región interior. No se observaron cambios drásticos en las concentraciones de los elementos con respecto a los anteriores espectros. Los elementos detectados fueron carbono y oxígeno principalmente adicional a los elementos de la HAP. En este caso se observaron trazas de Al y Na.

**Cara 1
Exterior**



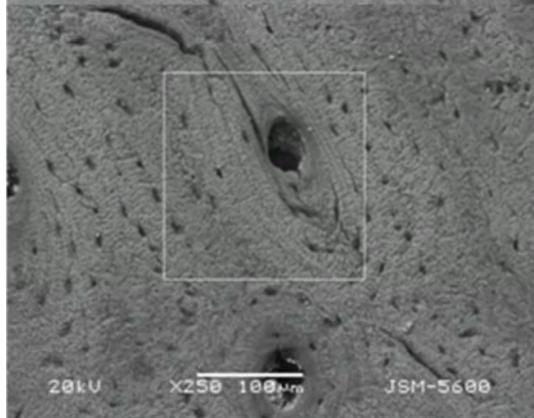
| Element | Atom % | Element Wt % |
|---------|--------|-----------------|
| O -K | 18.63 | 20.02 |
| C -K | 72.24 | 58.29 |
| Mg-K | 0.19 | 0.31 |
| P -K | 3.21 | 6.68 |
| Ca-K | 4.95 | 13.33 |
| Na-K | 0.18 | 0.28 |
| Al-K | 0.60 | 1.09 |
| Total | 100.00 | 100.00 |

**Cara 1
Medio**



| Element | Atom % | Element Wt % |
|---------|--------|-----------------|
| O -K | 27.85 | 28.81 |
| C -K | 62.14 | 48.26 |
| Mg-K | 0.19 | 0.29 |
| P -K | 4.05 | 8.10 |
| Ca-K | 5.35 | 13.86 |
| Na-K | 0.25 | 0.37 |
| Al-K | 0.18 | 0.31 |
| Total | 100.00 | 100.00 |

**Cara 1
Interior**



| Element | Atom % | Element Wt % |
|---------|--------|-----------------|
| O -K | 23.93 | 25.38 |
| C -K | 67.15 | 53.48 |
| Mg-K | 0.13 | 0.21 |
| P -K | 3.46 | 7.11 |
| Ca-K | 5.00 | 13.29 |
| Na-K | 0.24 | 0.37 |
| Al-K | 0.09 | 0.16 |
| Total | 100.00 | 100.00 |

Figura. 7.10 Espectro de EDS de la cara 1 para las regiones exterior, media e interior. Los elementos detectados fueron carbono y oxígeno principalmente adicional a los elementos de la HAP. Se observaron trazas de diferentes elementos.

Esto se puede observar en las figuras 7.11, 7.12 y 7.13, donde se presenta el espectro de EDS de la cara 2, 3 y 4 respectivamente. Los elementos detectados fueron carbono y oxígeno principalmente adicional a los elementos de la HAP. No se observaron cambios drásticos en las concentraciones de los elementos con respecto a los anteriores espectros.. Se observaron trazas de Si y Na principalmente.

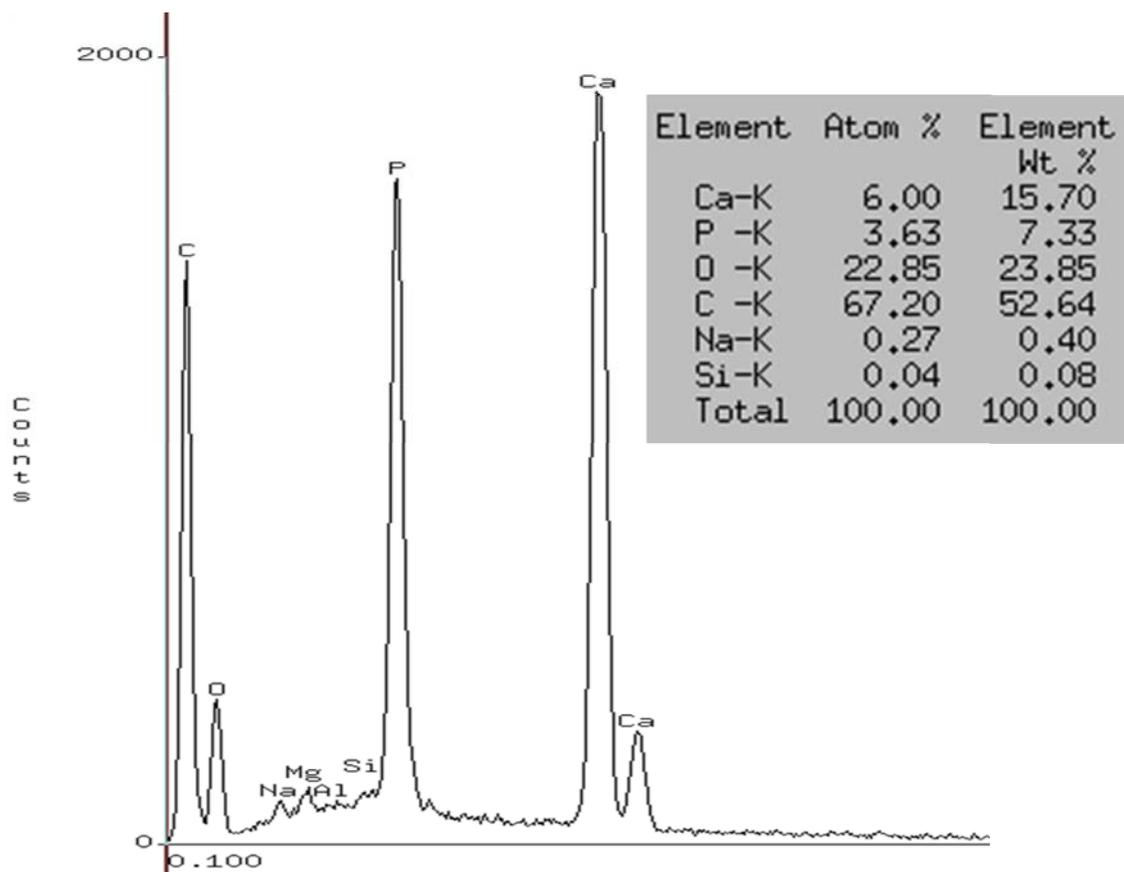


Figura. 7.11 Espectro de EDS de la cara 2 mostrada en la figura 7.1. Los elementos detectados fueron carbono y oxígeno principalmente adicional a los elementos de la HAP. Se observaron trazas de otros elementos.

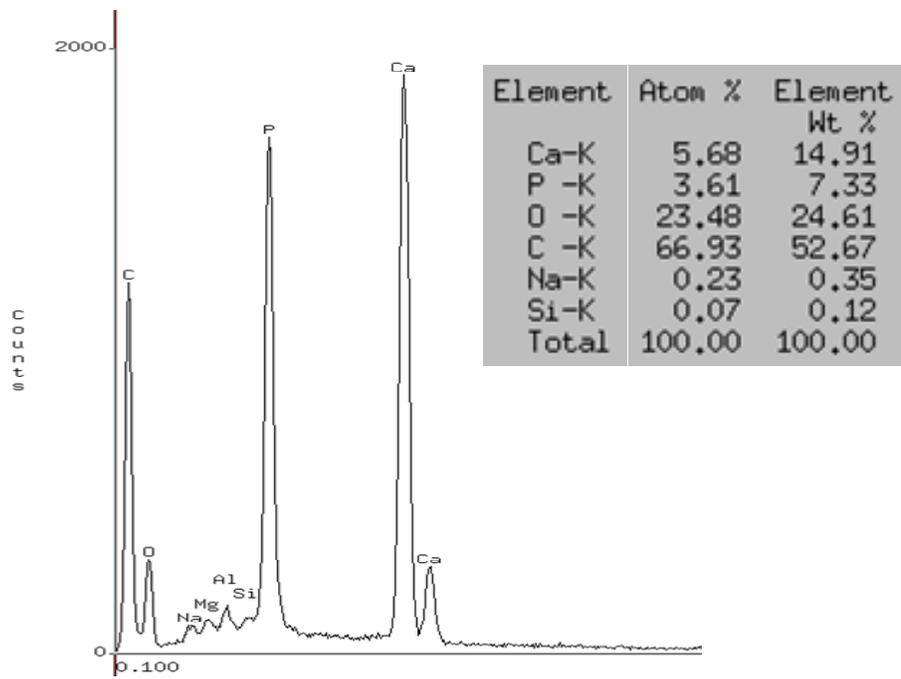


Figura. 7.12 Espectro de EDS de la cara 3 mostrada en la figura 7.1. Los elementos detectados fueron carbono y oxígeno principalmente adicional a los elementos de la HAP. Se observaron trazas de otros elementos.

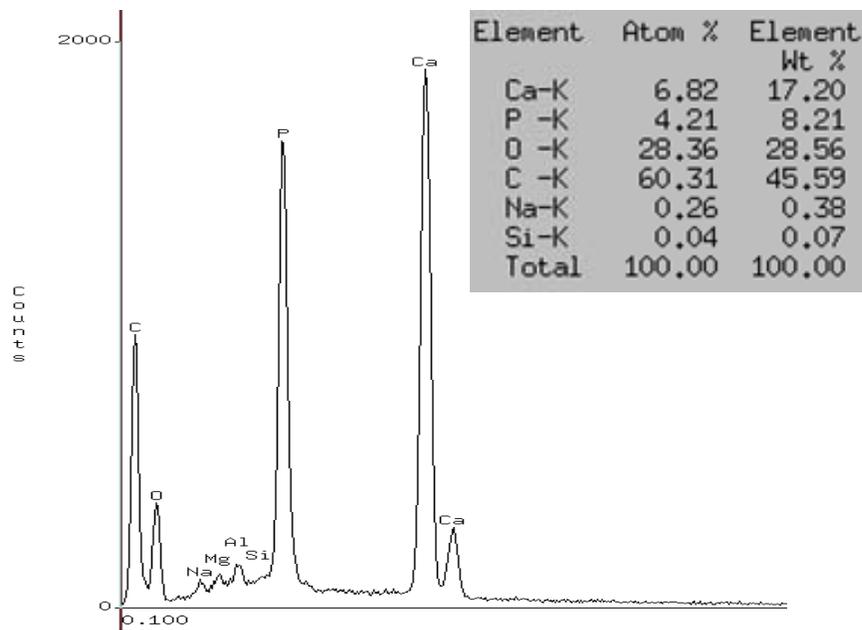


Figura. 7.13 Espectro de EDS de la cara 4 mostrada en la figura 7.1. Los elementos detectados fueron carbono y oxígeno principalmente adicional a los elementos de la HAP. Se observaron trazas de otros elementos.

Resultados de TEM

La muestra en polvo del hueso bovino fue colocada en la rejilla de cobre y observada por TEM tanto en el modo de campo claro como campo oscuro, adquiriendo también el patrón de difracción correspondiente. La Figura 7.14 presenta una imagen de TEM en campo claro del polvo del hueso. Obsérvese el tamaño que presentan los granos en este tipo de muestra. Los granos en contraste oscuro se encuentran en condición de Bragg, es decir que están dispersando fuertemente el haz electrónico de tal manera que los haces difractados no pasan por la apertura objetiva del microscopio. Figura 7.15 presenta el caso de una imagen de TEM en campo oscuro del polvo del hueso. En este caso, los haces difractados si pasan por la apertura objetiva y por lo tanto los granos en contraste brillante están en condición de Bragg. La Figura 7.16 presenta los patrones de difracción electrónica obtenidos de la muestra en polvo del hueso. Por lo tanto, los haces difractados forman anillos concéntricos. El anillo más intenso, de acuerdo a la tarjeta de rayos x JCPDF No.09-0432, corresponde al plano (211) la hidroxiapatita.

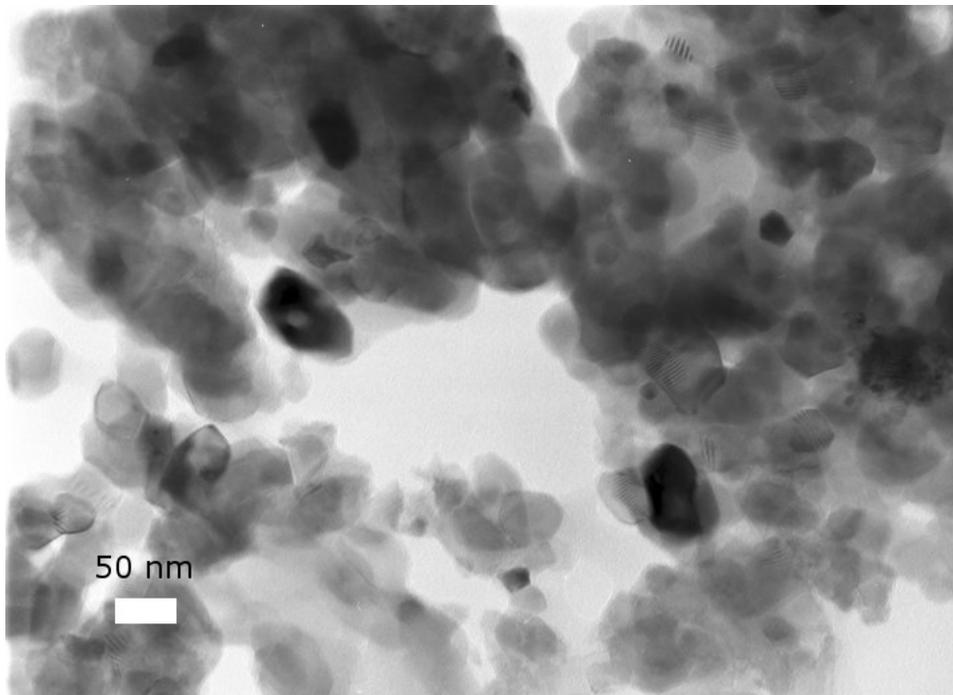


Figura 7.14 Imagen de TEM en campo claro del polvo del hueso. Obsérvese el tamaño que presentan los granos en este tipo de muestra. Los granos en contraste oscuro están en condición de Bragg.

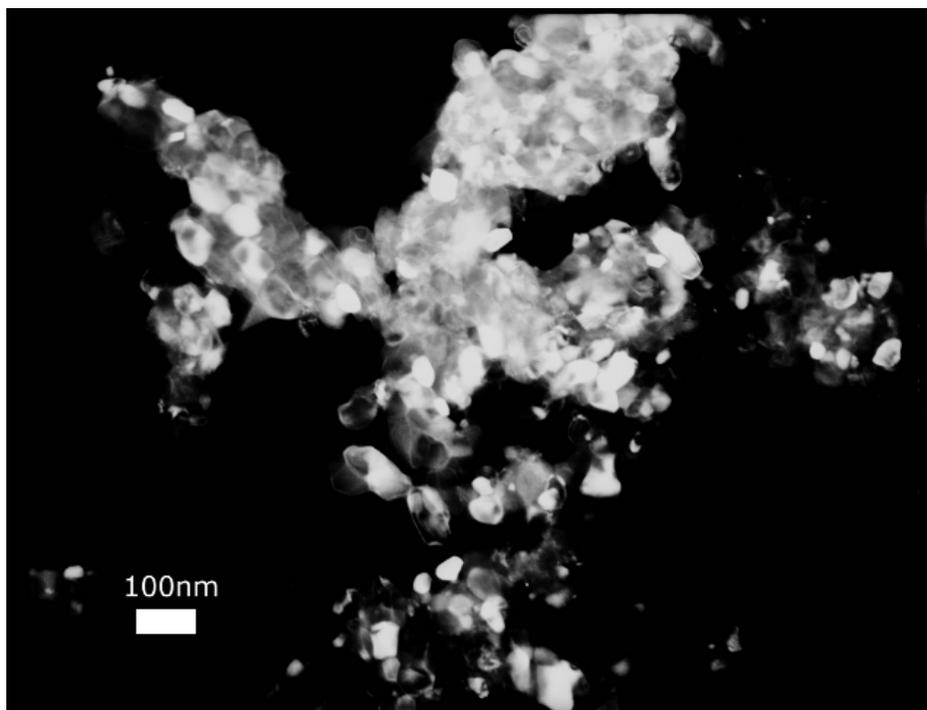


Figura 7.15 Imagen de TEM en campo oscuro del polvo del hueso. Obsérvese el tamaño que presentan los granos en este tipo de imagen. Los granos en contraste brillante están en condición de Bragg.

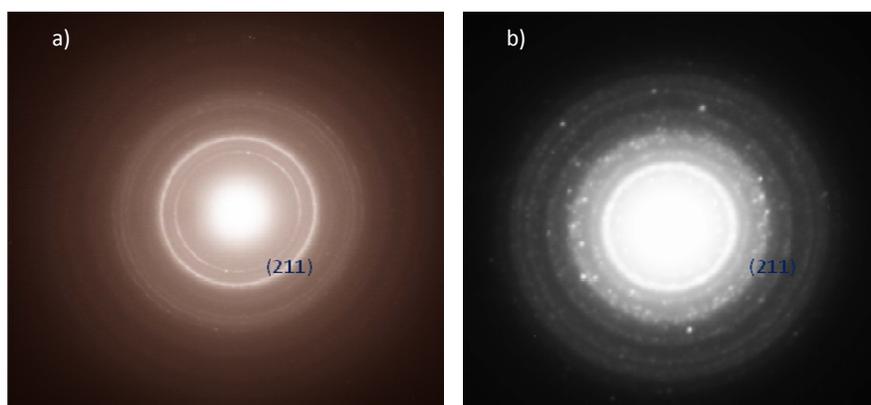


Figura 7.16 Imagen de los patrones de difracción electrónica en el TEM de la muestra en polvo del hueso. a) Muestra H13, b) Muestra HS1. De acuerdo a la tarjeta de rayos x JCPDF No.09-0432, correspondiente a la hidroxiapatita, el anillo más intenso corresponde al plano (211).

Resultados de granulometría por TEM

A partir de las imágenes de TEM como la mostrada en la figura 7.15 se realizó un análisis de los tamaños que presentan los cristales y se obtiene la distribución de tamaños (Anexo 2: Tratamiento de imágenes). La Figura 7.17 presenta el histograma de la distribución de tamaños de las áreas, largos y anchos de los cristales presentados en las imágenes de TEM para la muestra H13. Como se puede observar la distribución es no normal (como método de comprobación se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov), y por lo tanto no se obtienen las medidas de tendencia central. El histograma presenta la moda de las medidas. En este caso, la moda es de $25 \pm 25 \text{ nm}^2$. La Figura 7.18 presenta el Histograma de la distribución de tamaños de los cristales presentados en las imágenes de TEM para la muestra sinterizada HS1. En este caso, la moda es de $250 \pm 250 \text{ nm}^2$. Dado que el cristal presenta una morfología alargada, es necesario indicar el largo y el ancho de los cristales. La moda en el largo de los cristales fue de $2.25 \pm 2.25 \text{ nm}$ y $15 \pm 5 \text{ nm}$ para las muestras H13 y HS1 respectivamente, la moda en el ancho fue de $1 \pm 1 \text{ nm}$ y 7.5 ± 2.5 para H13 y HS1.

La prueba de Kolmogorov-Smirnov (prueba K-S) es una prueba para determinar que tan bien se ajusta una muestra a un modelo de distribución normal. En el anexo se presentan las características de estas pruebas estadísticas.

Se hicieron ajustes con distintas distribuciones de probabilidad para ver cuál de ellas representaba mejor el comportamiento de las muestras. En la Tabla 7.1 los datos se ordenan de acuerdo a la prueba de bondad de Kolmogorov-Smirnov. Tenemos tres conjuntos de datos (largo, ancho y área) para cada una de las dos muestras. Se han probado los ajustes con 60 distribuciones de probabilidad distintas para cada conjunto de datos y se ordenan de acuerdo al resultado de Kolmogorov-Smirnov, estando en las primeras posiciones aquellas distribuciones que mejor se ajustan según dicha prueba.

Se incluyen los parámetros de las aquellas distribuciones que ofrecen el mejor ajuste de acuerdo a Kolmogorov-Smirnov para la distribución de áreas de la muestra HS1 en la Tabla 7.2

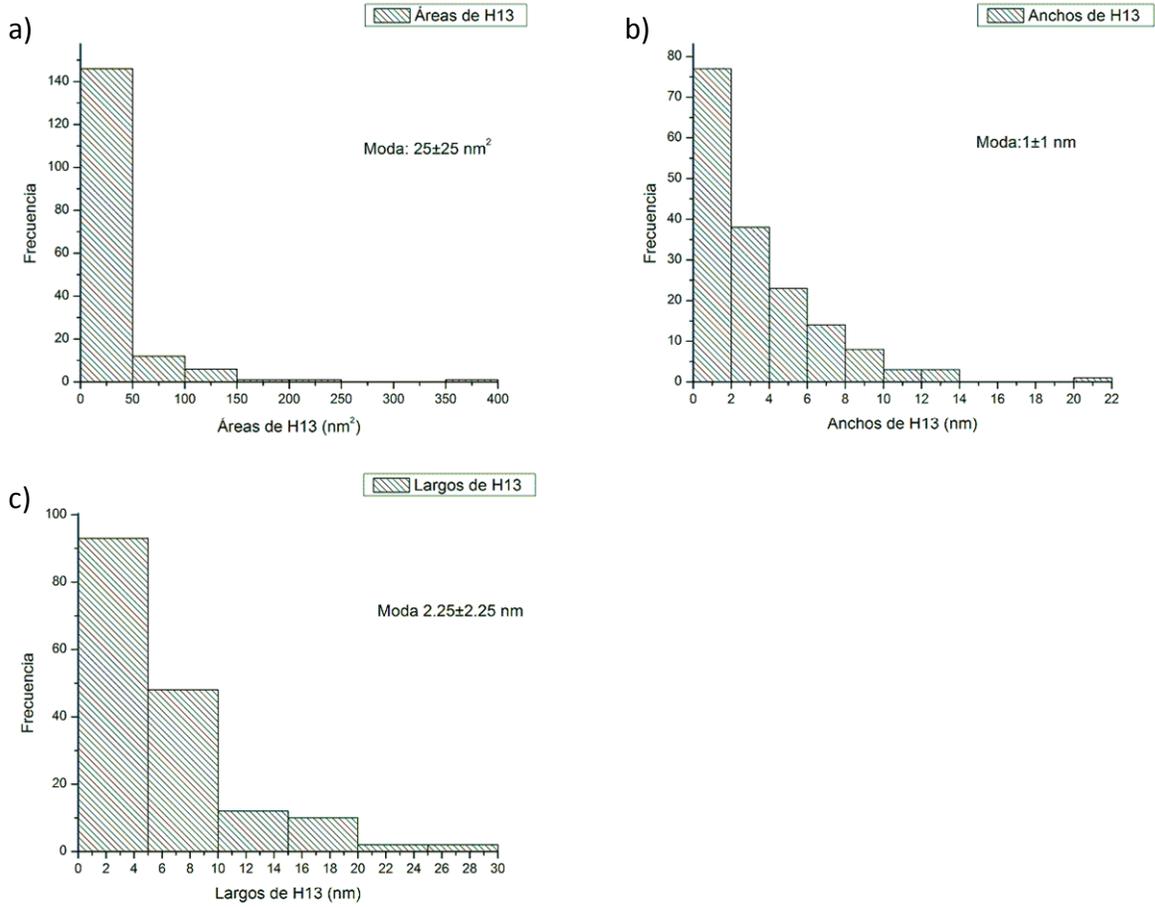


Fig. 7.17 Histograma de la distribución de tamaños - a) áreas, b) anchos y c) largos - de los cristales presentados en las imágenes de TEM para la muestra H13. Como método de comprobación se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (ver anexo).

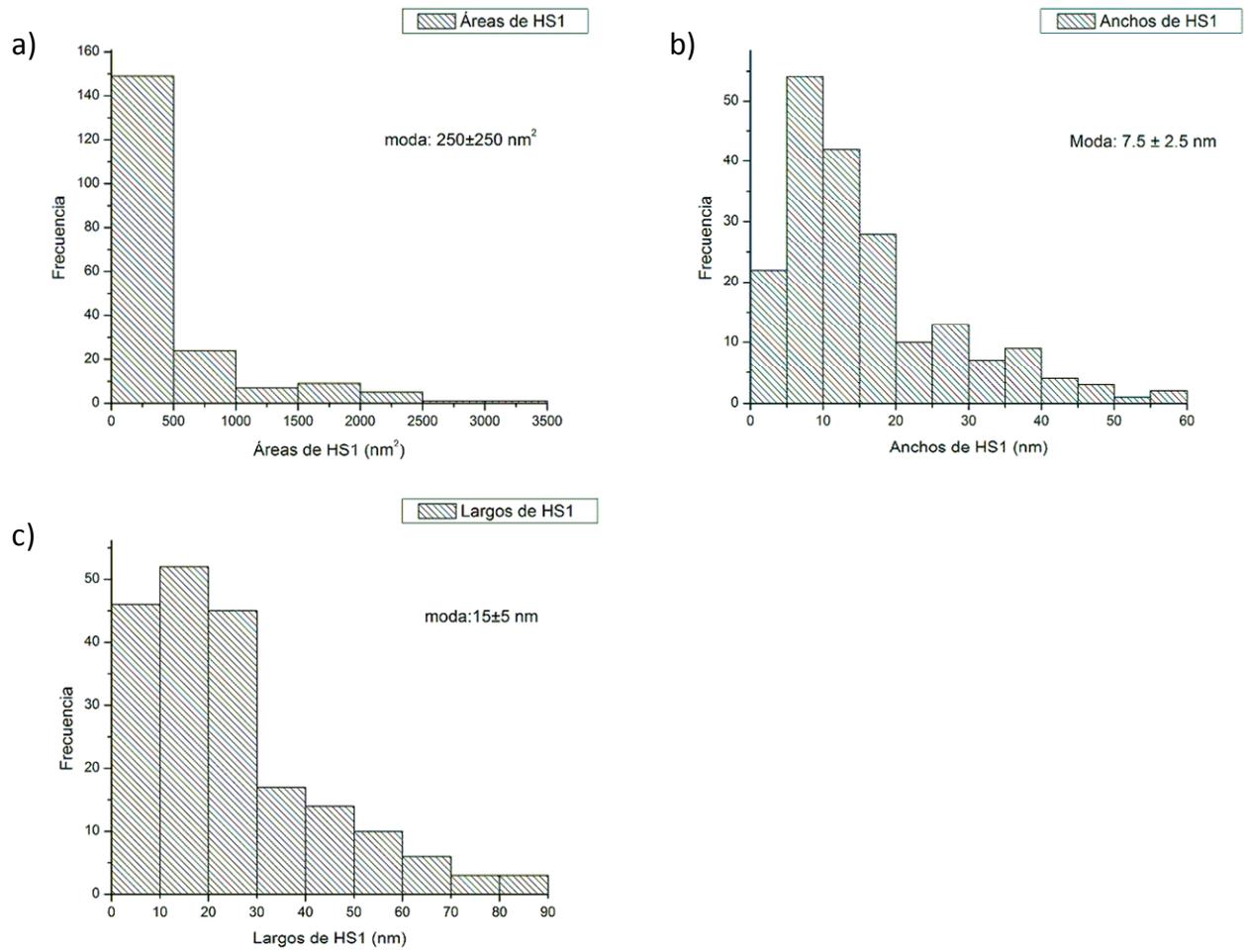


Fig. 7.18 Histograma de la distribución de tamaños – a) áreas, b) anchos y c) largos de los cristales presentados en las imágenes de TEM para la muestra sinterizada HS1. Como método de comprobación se aplicó la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov (ver anexo).

Tabla 7.1 Ajustes de probabilidad para las áreas de la muestra HS1

| Posición | Distribución | Estadística Kolmogorov Smirnov |
|----------|------------------------------|--------------------------------|
| 1 | Log-Pearson 3 | 0.0324 |
| 2 | Burr | 0.0386 |
| 3 | Pearson 6 | 0.0395 |
| 4 | Dagum | 0.0434 |
| 5 | Pareto 2 | 0.0441 |
| 6 | Log-Logistic (3P) | 0.0453 |
| 7 | Weibull (3P) | 0.0461 |
| 8 | Lognormal (3P) | 0.0480 |
| 9 | Inv. Gaussian (3P) | 0.0490 |
| 10 | Johnson SB | 0.0511 |
| 11 | Lognormal | 0.0515 |
| 12 | Log-Logistic | 0.0517 |
| 13 | Weibull | 0.0524 |
| 14 | Gen. Gamma (4P) | 0.0527 |
| 15 | Burr (4P) | 0.0528 |
| 16 | Fatigue Life (3P) | 0.0533 |
| 17 | Frechet (3P) | 0.0534 |
| 18 | Phased Bi-Weibull | 0.0606 |
| 19 | Kumaraswamy | 0.0641 |
| 20 | Gamma (3P) | 0.0686 |
| 21 | Pearson 6 (4P) | 0.0689 |
| 22 | Gamma | 0.0751 |
| 23 | Gen. Pareto | 0.0775 |
| 24 | Wakeby | 0.0775 |
| 25 | Log-Gamma | 0.0873 |
| 26 | Gen. Extreme Value | 0.0922 |
| 27 | Gen. Gamma | 0.0940 |
| 28 | Gen. Logistic | 0.0980 |
| 29 | Phased Bi-Exponential | 0.1070 |

| Posición | Distribución | Estadística Kolmogorov Smirnov |
|----------|-------------------------|--------------------------------|
| 30 | Beta | 0.1095 |
| 31 | Fatigue Life | 0.1144 |
| 32 | Frechet | 0.1224 |
| 33 | Levy (2P) | 0.1454 |
| 34 | Exponential | 0.1481 |
| 35 | Exponential (2P) | 0.1512 |
| 36 | Levy | 0.1515 |
| 37 | Inv. Gaussian | 0.1603 |
| 38 | Pearson 5 | 0.1654 |
| 39 | Pearson 5 (3P) | 0.2224 |
| 40 | Normal | 0.2282 |
| 41 | Logistic | 0.2306 |
| 42 | Gumbel Max | 0.2324 |
| 43 | Pert | 0.2407 |
| 44 | Cauchy | 0.2412 |
| 45 | Hypersecant | 0.2415 |
| 46 | Reciprocal | 0.2440 |
| 47 | Rayleigh (2P) | 0.2580 |
| 48 | Error | 0.2690 |
| 49 | Laplace | 0.2690 |
| 50 | Uniform | 0.2850 |
| 51 | Gumbel Min | 0.2915 |
| 52 | Power Function | 0.2915 |
| 53 | Pareto | 0.3359 |
| 54 | Rayleigh | 0.3537 |
| 55 | Dagum (4P) | 0.3761 |
| 56 | Triangular | 0.4653 |
| 57 | Rice | 0.4726 |
| 58 | Error Function | 0.5021 |
| 59 | Chi-Squared (2P) | 0.6396 |
| 60 | Chi-Squared | 0.6583 |
| 61 | Student's t | 0.9809 |

Tabla 7.2 Parámetros de las distribuciones con mejor ajuste correspondientes a HS1

| | Bondad del ajuste según Kolmogoro v-Smirnov | Parámetros | Media | Desv. Std. | Mínimo | Moda |
|---------------------------|---|---|--------|------------|---------|--------|
| Log-Pearson 3 Burr | 0.03242 | $\alpha=27.458 \quad \beta=-0.28298 \quad \gamma=12.956$ | 452.19 | 774.41 | 0 | 12.355 |
| Pearson 6 | 0.03862 | $k=4.2549 \quad \alpha=0.87883 \quad \beta=1532.4$ | 437.77 | 734.16 | 0 | 0 |
| Dagum | 0.03949 | $\alpha_1=0.90801 \quad \alpha_2=2.5938 \quad \beta=791.51$ | 450.93 | 971.35 | 0 | 0 |
| Pareto 2 | 0.04341 | $k=0.60722 \quad \alpha=1.4536 \quad \beta=344.71$ | 603.42 | ND | 0 | 0 |
| Log-Logistic (3P) | 0.04406 | $\alpha=2.2062 \quad \beta=562.01$ | 465.93 | 1524.1 | 0 | 0 |
| Weibull (3P) | 0.04525 | $\alpha=1.1176 \quad \beta=184.81 \quad \gamma=2.7558$ | 1603.3 | ND | 2.7558 | 16.668 |
| Lognormal (3P) | 0.04612 | $\alpha=0.73401 \quad \beta=349.39 \quad \gamma=2.9584$ | 426.58 | 587.06 | 2.9584 | 2.9584 |
| Inv. Gaussian (3P) | 0.04801 | $\sigma=1.4571 \quad \mu=5.2009 \quad \gamma=-0.84735$ | 523.67 | 1422.7 | -0.8474 | 20.862 |
| Johnson SB | 0.049 | $\lambda=166.62 \quad \mu=449.61 \quad \gamma=-21.56$ $\gamma=1.6355 \quad \delta=0.56938$ | 428.05 | 738.57 | -21.56 | 33.157 |
| Lognormal | 0.05114 | $\lambda=3422.4 \quad \xi=6.7994$ | | | | |
| Log-Logistic | 0.0515 | $\sigma=1.479 \quad \mu=5.1862$ | 533.75 | 1501.4 | 0 | 20.061 |
| Weibull | 0.05169 | $\alpha=1.171 \quad \beta=176.19$ | 1067.4 | | | 20.113 |
| | 0.05236 | $\alpha=0.83034 \quad \beta=348.75$ | 385.16 | 466.5 | 0 | 0 |

A pesar de tener una posición mejor de acuerdo a K-S, las primeras distribuciones de la Tabla ofrecen un valor mínimo de cero, incluso algunas dan una moda de cero, lo cuál evidentemente no corresponde a la realidad, por lo tanto se descartan. Luego entonces del conjunto restante tenemos que sólo dos distribuciones nos dan un mínimo positivo. La Log-Logistic (3P) y la Weibull (3P), sin embargo para la Log-Logistic (3P) no se calcula la desviación estándar y para la Weibull tenemos que la media menos una desviación estándar nos da valores negativos. Lo mismo sucede para el resto de las distribuciones en esta muestra. Este comportamiento se presenta para otro conjunto de datos. Es por eso que como medida de tendencia sólo se ofrece la moda obtenida a través del histograma.

Las medidas obtenidas de la granulometría nos pueden dar una aproximación a la morfología de las muestras como se muestra en la Tabla 7.3.

Tabla 7.3 Morfología de las muestras

| Muestra | Moda Ancho (nm) | Moda Largo (nm) | Morfología |
|---------|-----------------|-----------------|-------------|
| H13 | 1±1 | 2.5±2.5 | Rectangular |
| HS1 | 7.5±2.5 | 15±5 | Rectangular |

Resultados de FTIR

La Figura 7.19 presenta los espectros de FTIR de las muestras HS1 y H13 dentro del rango 1400 a 500 cm^{-1} donde se encuentran las bandas características de la mayoría de las moléculas que conforman estos materiales. En la Figura 7.19 se observan las bandas características del PO_4^{3-} (en 2140-1980, 1090-1032, 960 and 600-500 cm^{-1}), del agua absorbida (banda ancha en 3700-3400 cm^{-1} and 1640-1595 cm^{-1}), y del OH^- (en 3565 and 633 cm^{-1}). Además, también se observan las bandas de carbonato en 1550, 1460, 1445, 1415 y 870 cm^{-1} , y las bandas de material orgánico (bandas CH en 2930 y 2860 cm^{-1}). Rehman y Bonfield[28] reportaron espectros de FTIR de la HAP sintética similares a los mostrados en la Figura 7.19. Nótese la mejor definición de las bandas en la muestra HS1 que las bandas en la muestra H13. Esto permite predecir que, por las alturas de éstos y de acuerdo al método para medir este índice (lo cuál fue discutido en la sección 4), el índice de cristalinidad calculado por FTIR será mayor para el caso de la muestra HS1.

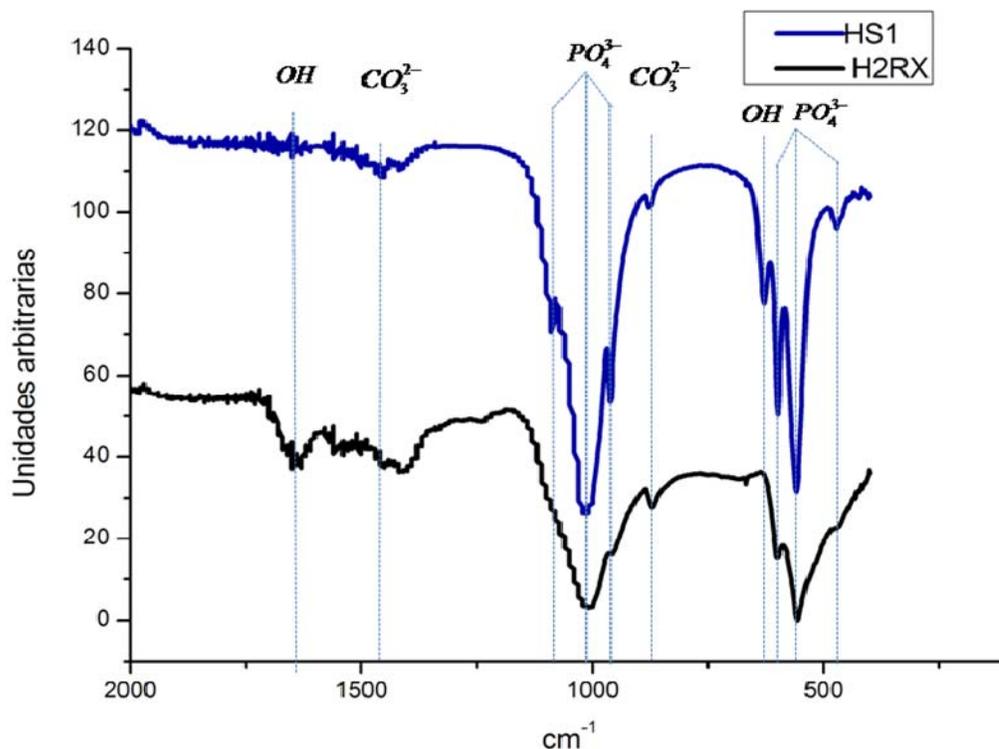


Fig. 7.19 Espectros de FTIR de las muestras HS1 y H13 . Los modos vibracionales de los grupos funcionales correspondientes a la hidroxiapatita están indicados. Nótese la mejor definición de las bandas en la muestra HS1 que las bandas en la muestra H13.

Resultados de DRx

En la Figura 7.20 se presentan los difractogramas para las muestras H13 y HS1. Nótese que la muestra HS1 presenta picos más definidos y más altos. En el caso de la muestra H13 incluso algunos de los picos no estarán definidos a tal punto que su altura será considerada como cero en la medida del índice de cristalinidad.

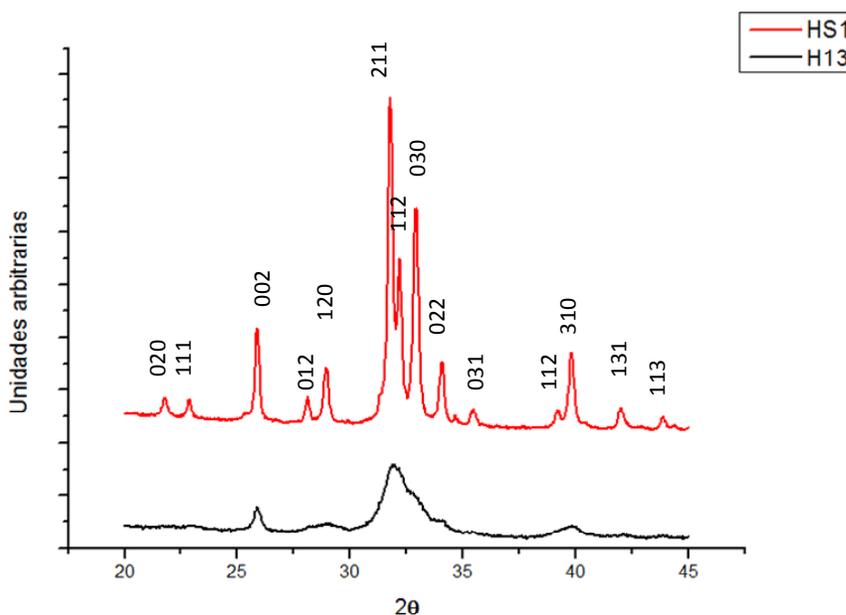


Fig. 7.20 Difractogramas para las muestras H13 y HS1. Obsérvese que la muestra HS1 presenta picos más definidos y más altos, dando una referencia inmediata de la cristalinidad que presentan.

Refinamiento Rietveld

Una vez que se han obtenido los resultados de DRx se procede a hacer el refinamiento Rietveld. Este nos reporta un tamaño de cristal de 1.92 ± 0.05 nm para la muestra H13 y de 51.97 ± 1.93 nm para la muestra HS1 como se refiere en la Tabla 7.4. Para el refinamiento se utilizaron las posiciones proporcionadas en el artículo de A.S. Posner[5].

Tabla 7.4 Resultados del refinamiento Rietveld

| | Tamaño de cristal | Residuo |
|-----|-------------------|---------|
| H13 | 1.92±0.05 nm | 9.68 |
| HS1 | 51.97±1.93 | 22.11 |

Se puede observar el incremento del tamaño de cristal debido a la sinterización.

Cálculo de los Índices de Cristalinidad $(IC)_{DRx}$ y $(IC)_{FTIR}$

La Tabla 7.5 presenta los valores de los índices de cristalinidad $(IC)_{DRx}$ y $(IC)_{FTIR}$ calculados a partir de las relaciones comentadas en la sección 4. Los valores del índice de cristalinidad calculados para $(IC)_{DRx}$ en el caso de la muestra H13 fue de 0.01, y para la muestra HS1 fue de 0.97, indicando que la muestra HS1 es mas cristalina que la muestra H13 , lo cual era lo que se esperaba a partir de los espectros de Rayos X de la figura 7.20. También se han incluido los valores de estos índices para el caso de la HAP sintética con la idea de establecer una comparación. Los valores del índice de cristalinidad para la HAP sintética $(IC)_{FTIR}$ son de 0.14 por el método de áreas y 4.26 por el método de líneas. Los datos de la Tabla 7.5 se representan de manera gráfica en la figura 7.21.

Nótese que el índice de cristalinidad tiene una tendencia a ser mayor a medida que el espectro de la muestra sea más definido. También nótese que el valor de $(IC)_{DRx}$ es menor o igual a 1.5 mientras que el valor de $(IC)_{FTIR}$ dependerá del método a utilizar. En el caso del método de las áreas el valor es menor a 0.5, mientras que en el caso del método de líneas es mayor de 2.

La Tabla 7.6 presenta los valores de los índices de cristalinidad $(IC)_{DRx}$ y $(IC)_{FTIR}$ reportados para el caso del esmalte y dentina dental humanos. Estos valores sirven de comparación para los valores mostrados en la Tabla 7.5. Los datos de la Tabla 7.6 se representan de manera gráfica en la figura 7.22.

Los valores calculados para $(IC)_{FTIR}$ en el caso de la muestra H13 fueron de 0.09 y de 3.58 para los métodos de áreas y líneas respectivamente. En el caso de la muestra HS1 estos valores fueron de 0.13 y 4.32 respectivamente. Estos valores indican en ambos casos que la muestra HS1 es nuevamente más cristalina que la muestra H13.

Tabla 7.5 Valores de los índices de cristalinidad $(IC)_{DRx}$ y $(IC)_{FTIR}$

| Muestra | Índice de cristalinidad | | | | | | Tamaño de cristal | | | |
|---------------|-------------------------|------|-------------|------|------|------|-------------------|------------------------|-----------------|-----------------|
| | I.R. Área | | I.R. Líneas | | DRx | | Scherrer (nm) | TEM (nm ²) | Largos TEM (nm) | Anchos TEM (nm) |
| | IC | %C | IC | %C | IC | %C | | | | |
| H13 | 0.09 | 18.0 | 3.58 | 55.1 | 0.01 | 0.7 | 14.60 | 25 ± 25 | 1±1 | 2.5±2.5 |
| HS1(Temp) | 0.13 | 26.0 | 4.32 | 66.5 | 0.97 | 64.7 | 62.39 | 250 ± 250 | 7.5±2.5 | 15±5 |
| HAP sintética | 0.14 | 28.0 | 4.26 | 65.5 | 1.19 | 79.3 | 54.93 | | | |

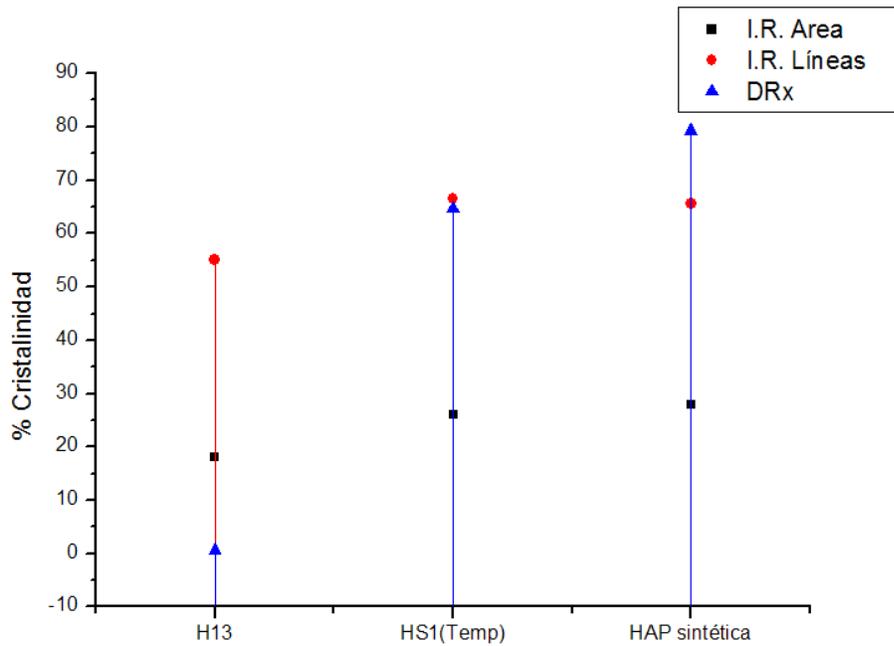


Figura 7.21 Gráficas de porcentaje de cristalinidad correspondientes a la Tabla 7.5

Tabla 7.6. Valores de los índices de cristalinidad $(IC)_{DRx}$ y $(IC)_{FTIR}$

| Muestra | Índice de Cristalinidad | | | | | |
|----------------|-------------------------|-------|----------------|-------|----------|-------|
| | I. R. Área | | I.R. Líneas | | DRx | |
| | IC | %C | IC | %C | IC | %C |
| Esmalte Dental | 0.086 | 17.2 | 3.46 | 53.2 | 1.21 | 80.67 |
| Dentina Dental | 0.083 | 16.6 | 3.44 | 52.9 | 0.39 | 26.00 |
| Valor Máximo | 0.5 | 100.0 | ∞ (6.5) | 100.0 | 1.5 | 100.0 |
| Valor Mínimo | 0 | 0.0 | 2.0 | 0.0 | ~ 0 | 0.0 |

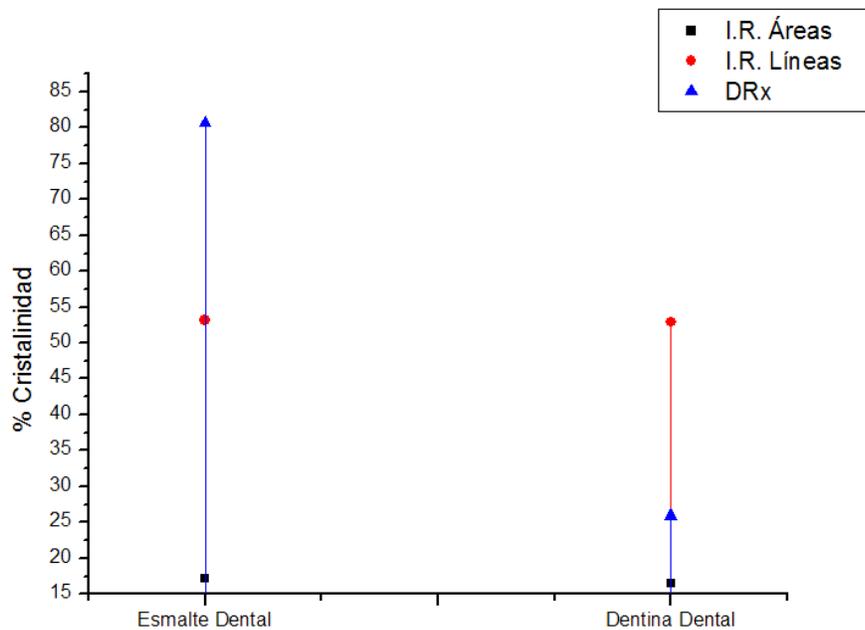


Figura 7.22 Gráficas de porcentaje de cristalinidad correspondientes a la Tabla 7.6

Cálculo del porcentaje de cristalinidad

En la Tabla 7.6 se presentan los valores máximos y mínimos reportados y/o calculados para el índice de cristalinidad de IR y de DRx. El valor máximo indicaría un 100% de cristalinidad para la muestra en estudio mientras que el valor mínimo correspondería al caso en el que la muestra presenta un 100% de fase amorfa. Tomando en cuenta estos valores

límite podemos calcular un valor aproximado del porcentaje de cristalinidad presentado en nuestras muestras. De esta manera tomando el valor de 0.5 para la muestra con un máximo porcentaje de cristalinidad y haciendo una relación lineal se observa en la Tabla 7.5 que la muestra H13 es la que menor porcentaje de cristalinidad presenta (18%) mientras que para la muestra HS1 es de 26%. La muestra sintética corresponde al 28%.

En el método de líneas hemos considerado que, tomando en cuenta los valores obtenidos en el presente trabajo y los reportados en las referencias, el valor de 6.5 representa el valor máximo para una muestra 100% de fase cristalina. Esto da como resultado que la muestra H13 resulta con un 55.1% de cristalinidad y la muestra HS1 con un 66.5% de cristalinidad, mientras que la muestra sintética representa un 65.5% de cristalinidad.

El método de DRx, tomando en cuenta que el valor de 1.5 corresponde al 100% de cristalinidad, indicó que la muestra H13 es la menos cristalina de todas con un 0.7% de cristalinidad. La muestra HS1 representa un 64.7% de cristalinidad mientras que la muestra sintética correspondió al 79.3% de cristalinidad.

Capítulo 8. Discusión

El índice de cristalinidad es una medida del porcentaje de material cristalino en una muestra dada. Por lo tanto, el contar con un método sencillo para medirlo es muy importante y resultaría muy útil en el análisis de materiales cristalinos.

Haciendo un breve resumen de los resultados obtenidos en la sección anterior se tiene que:

- Los índices de cristalinidad para el hueso bovino (muestra H13) fueron $(IC)_{DRx} = 0.01$, $(IC)_{FTIR(\text{área})} = 0.09$ y $(IC)_{FTIR(\text{líneas})} = 3.58$, lo que representa una fase cristalina de 0.7%, 55.1% y 18% respectivamente.
- El tamaño de cristal presentó una moda de 25 nm^2 , pero con una gran dispersión en tamaños.
- La muestra HS1, la cual se sometió a calentamiento, presenta mayor cristalinidad: $(IC)_{DRx} = 0.97$, $(IC)_{FTIR(\text{área})} = 0.13$ y $(IC)_{FTIR(\text{líneas})} = 4.32$, lo que representa una fase cristalina de 64.7%, 26.0% y 66.5% respectivamente.
- La fórmula de Scherrer da un límite inferior para el tamaño de cristal dado que no toma en cuenta ensanchamientos de pico debido a factores importantes como efectos instrumentales y esfuerzos no homogéneos.

Como puede observarse hay una gran disparidad entre los porcentajes de cristalinidad que se miden para cada muestra por los distintos métodos. Esto indica que se requiere un estudio más detallado del significado de estos valores.

El índice de cristalinidad $(IC)_{DRx}$ se relaciona tanto con el tamaño del cristal de la muestra como con el grado de orden cristalino dentro de los cristales ya que los cristales grandes con baja densidad de deformación y de defectos son característicos de muestras con alto porcentaje de cristalinidad, mientras que lo contrario es cierto para materiales con bajo porcentaje de cristalinidad.

El índice de cristalinidad $(IC)_{FTIR}$ es además una medida del grado de deformación geométrica (no necesariamente implica un cambio en la simetría del cristal) de los enlaces moleculares dentro de la estructura. Ya que estos enlaces son dependientes tanto de la composición de la muestra como de la temperatura, es de esperarse que el $(IC)_{FTIR}$ varíe con

estos parámetros. Además, de los dos métodos para medir el $(IC)_{FTIR}$, el método de las áreas presenta resultados similares a los resultados de cristalinidad medidos por rayos x (I.C. DRx).

Por lo tanto, los índices $(IC)_{DRx}$ e $(IC)_{FTIR}$ miden diversos parámetros: $(IC)_{DRx}$ se relaciona con el tamaño del cristal de la muestra y $(IC)_{FTIR}$ se relaciona con los enlaces atómicos de la muestra. Sin embargo, ambos representan una medida cualitativa del porcentaje de fase cristalina en una muestra.

Tanto los valores del índice de cristalinidad medidos por el método de rayos x (I.C. DRx), como por el método de espectroscopía infrarroja, presentan la tendencia correcta con respecto a la estructura de la muestra. Es decir, cuando el material no es altamente cristalino, se obtiene un valor bajo con respecto a un material más cristalino. Sin embargo, los valores como tales no corresponden cuantitativamente hablando.

Por lo tanto, la sugerencia que tenemos en este momento a partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis es que se tomen los valores que se obtienen para el índice de cristalinidad por ambas técnicas pero sólo como una medida completamente cualitativa, no cuantitativa. Se requiere de una metodología más detallada que nos permita definir con mayor precisión la relación existente entre los valores obtenidos con las diferentes técnicas, ya que, como podemos darnos cuenta, el porcentaje de cristalinidad de un material si se refleja en sus respectivos espectros de difracción de rayos x y en sus espectros de espectroscopía infrarroja. Por lo cual, y por el momento, podemos tomar con mucha reserva los datos que se obtengan para hacer una comparación cuantitativa.

Todo lo anterior implica que sí contamos de forma cualitativa con un método rápido y fácil de obtener el índice de cristalinidad de un material, sólo debemos de tener cuidado de no mezclar información entre los espectros de rayos x y los espectros de espectroscopía infrarroja de manera indiscriminada, hasta no realizar un análisis más detallado del tema.

De esta manera hemos encontrado que los valores del índice de cristalinidad obtenidos por FTIR, DRx y TEM presentan la misma tendencia al ser medidos no obstante que cada técnica mide parámetros distintos del sistema.

Algo muy notorio al comparar los resultados de este trabajo de tesis con otros trabajos sobre el índice de cristalinidad actualmente publicados es que ellos no contrastan sus resultados con estudios por TEM, luego entonces no realizan un tratamiento estadístico de las distribuciones de granulometría resultantes o bien asumen que lo que están estudiando

es una distribución normal (algo que, al menos en el caso de las muestras que se utilizaron en la presente tesis -y considerando que las mismas son representativas en general de las estructuras y características del hueso-, no es correcto).

Se puede observar alguna relación entre los índices de cristalinidad: $(IC)_{FTIR(\text{área})}$ e $(IC)_{DRx}$ notando que existe una relación lineal entre ellas (Figura 8.1). No se aprecia una relación entre el $(IC)_{FTIR(\text{líneas})}$ y el $(IC)_{FTIR(\text{área})}$. Para poder determinar con mayor certeza el tipo de relación (si es que existe) entre $(IC)_{FTIR(\text{área})}$ o $(IC)_{FTIR(\text{líneas})}$ y el $(IC)_{DRx}$ se requieren una mayor cantidad de puntos (es decir, se requiere considerar una mayor cantidad de muestras).

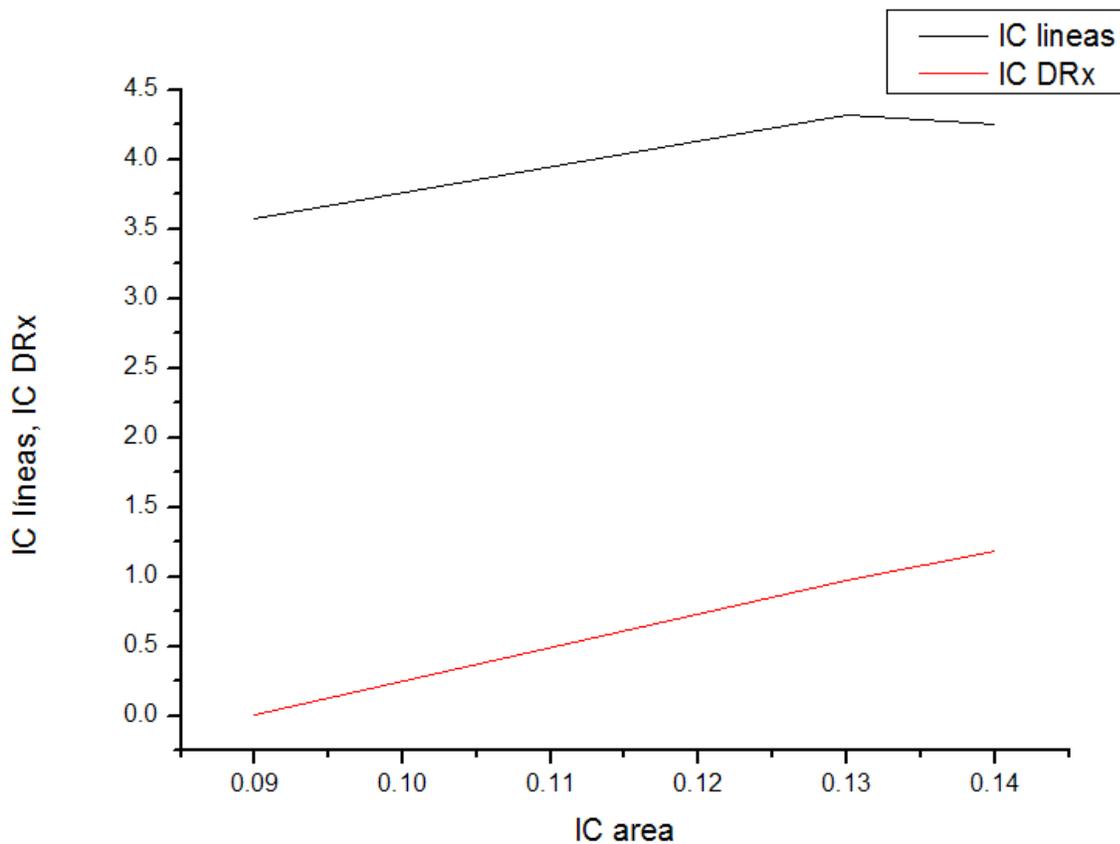


Figura 8.1 Gráfica de $(IC)_{FTIR(\text{líneas})}$ e $(IC)_{DRx}$ vs $(IC)_{FTIR(\text{área})}$

Conclusiones

- 1) Los índices $(IC)_{DRX}$ y $(IC)_{FTIR}$ representan una medida rápida y cualitativa, no cuantitativa, del porcentaje de fase cristalina en las muestras de diáfisis de hueso bovino utilizadas.
- 2) Existe una relación aún oculta entre el tamaño de cristal y el índice de cristalinidad. La ecuación de Scherrer y las imágenes de TEM proporcionan el tamaño de cristal del hueso bovino, pero solo cualitativamente presenta una correlación con el índice de cristalinidad.

Referencias

[1] Currey J. D. Bones: structure and mechanics. Princeton University Press (2002). Cap 1, pp 4-9.

[2] Wikipedia. <http://es.wikipedia.org/wiki/Hueso>

[3] Rogers K. Bone and Muscle. Structure, Force and motion. Britannica Educational Publishing (2011) Cap 2, pp 46-48

[4] Budras K. D. y Habel R. E. Bovine anatomy: an illustrated text. Schlütersche GmbH & Co. 2003. Cap 1, p. 3.

[5] Posner A. S., Perlof A. y Diorio A. F. Refinement of the hydroxyapatite structure. Acta Crystallographica. 1958:11, 308-309.

[6] Rojas-Dotor S. y Domínguez-Hernández V. M. Alternativas para obtener un injerto óseo. Acta Ortopédica Mexicana. 2002:16, 225-230.

[7] Martínez-Valencia A.B., Esparza-Ponce H.E., Carbajal-De la Torre G. y Ortiz-Landeros J. Caracterización estructural y morfológica de hidroxiapatita nanoestructurada: estudio comparativo de diferentes métodos de síntesis. Superficies y Vacío. 2008: 21, 18-21.

[8] Galia C. R., Macedo C. A., Rosito R., Muller de Mello T., Araújo Quaresma Camargo L. M. y Moreira L. F., In vitro and in vivo evaluation of lyophilized bovine bone biocompatibility. Clinics. 2008: 63, 801-806.

[9] Person A. Early Diagenetic evolution of bone phosphate: An X-Ray diffractometry analysis. Journal of Archaeological Science. 1995: 22, 211-221.

[10] Pollard M. y Heron C., Archaeological Chemistry (2nd ed.). Cambridge: Royal Society of

Chemistry. (2008). Cap 10, pp. 310-373.

[11] <http://encyclopedia2.thefreedictionary.com/Granulometry> (The Great Soviet Encyclopedia, 3a. Ed. (1970-1979). The Gale Group Inc.).

[12] Will G., Powder diffraction: The Rietveld method and the two stage method. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2006. Cap 1 y 2, pp 1-78.

[13] <http://en.wikipedia.org/wiki/Crystallinity> (Oxford dictionary of science. Oxford University Press, 1999).

[14] Celotti G., Tampieri A., Sprio S., Landi E., Bertinetti L., Martra G. y Ducati C. Crystallinity in apatites: how can a truly disordered fraction be distinguished from nanosize crystalline domains. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2006:17, 1079-1087.

[15] Balan E., Delattre S., Roche D., Segalen L., Morin G., Guillaumet M., Blanchard M., Lazzeri M. Brouder C. y Salje E. K. H.

[16] Shemesh A. Crystallinity and diagenesis of sedimentary apatites. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1990: 54, 2433–2438.

[17] Termine J. D., Posner A. S. Infrared Analysis of Rat Bone: Age Dependency of Amorphous and Crystalline Mineral Fractions. *Nature* 1990:11, 268-270.

[18] Featherstone J. D. B., Pearson S., LeGeros R. Z. An Infrared Method for Quantification of Carbonate in Carbonated Apatites. *Caries Research* 1984:18, 63-66.

[19] Alvarez-Lloret P., Rodriguez-Navarro A. B., Romanek Ch. S., Gaines K. F. y Congdon J. Quantitative analysis of bone mineral using FTIR. *Macla 6 XXVI reunión (SEM)/ XX reunión (SEA)*. 2006, 45-47

[20] Sari Y. W., Soejoko D. S. y Dahlan K. Nanostructure in Bone Apatite. *IFMBE Proceedings*

2007: 15, 118-121.

[21] DeGraef M. y McHenry M. E. Structure of materials. An introduction to crystallography, diffraction and symmetry. Cambridge University Press (2007). Cap. 11 pp 258-289.

[22] Manual del programa Easy Fit.

[23] Toque J.A., Herliansyah M.K., Hamdi M., Ide-Ektessabi A. y Wildan M.W.. The effect of sample preparation and calcinations temperature on the production of hydroxyapatite. Biomed 06, IFMBE Proceedings 2007:15, 152-155.

[24] Anderson I. A., Mucalo M. R., Johnson G. S. y Lorier M. A. The processing and characterization of animal-derived bone to yield materials with biomedical applications. Journal of Materials Science: Materials in 2000:11, 743-749.

[25] Zhang Xuebin, Ding Yunfei, Wang Songlin, XuJie y Feng Yi. Sintering behavior and kinetic evaluation of hydroxyapatite bio-ceramics from bovine bone. Ceramics-Silikáty 2010:54, 248-252.

[26] Panda R. N., Hsieh M. F., Chung R. J. y Chin T. S. FTIR, DRx, SEM and solid state NMR investigations of carbonate- containing hydroxyapatite nano-particles synthesized by hydroxide-gel technique. Journal of Physics and Chemistry of Solids 2003: 64, 193-199.

[27] Su X., Sun K., Cui F. Z. y Landis W.J. Organization of apatite crystals in human woven bone. Bone 2003:32, 150-162.

[28] Rehman I., Bonfield W., Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy, Journal of Materials Science: Materials in medicine 1997:8, 1-4.

[29] Sari Y. W., Soejoko D. S. y Dahlan K. Nanostructure in bone apatite. Biomed 06, IFMBE Proceedings 2007:15, 118-121.

- [30] Miller L. M., Vairavamurthy V., Chance M. R., Mendelsohn R., Paschalis E. P., Betts F. y Boskey A. L. In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the $\nu_1, \nu_3 PO_4^{3-}$ vibration. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001:1527, 11-19.
- [31] Farlay D., Panczer G., Rey C., Delmas P. y Boivin G. Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics in bone mineral. *J Bone Miner Metab* 2010:28, 433-445.
- [32] Abraham J. A., Sánchez H. J., Marcelli C. A., Grenón M., Guidi M. C. y Piccinini M. A crystallinity study of dental tissues and tartar by infrared spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 2011:399, 1699-1704.
- [33] Merino L. y Morales J. Relación del índice de cristalinidad (IC) con la edad y el contenido de iones F y CO₃ en muestras de vertebrados fósiles. *Estudios geológicos* 2008: 64, 75-87.
- [34] Hench L. L. y Wilson J. An introduction to bioceramics. World Scientific 1999 Cap. 9 pp. 139-148

Anexo: Estadística

A continuación se detallan las distribuciones que se utilizarán posteriormente junto con una breve descripción de sus respectivos parámetros. [22]

Distribución Log-Pearson 3

Parámetros

α – parámetro continuo ($\alpha > 0$)

β – parámetro continuo ($\beta \neq 0$)

γ – parámetro continuo.

Dominio

$$0 < x \leq e^\gamma \quad \beta < 0$$

$$e^\gamma \leq x < \infty \quad \beta > 0$$

Función de densidad de probabilidad

$$f(x) = \frac{1}{x|\beta|\Gamma(\alpha)} \left(\frac{\ln(x) - \gamma}{\beta} \right)^{\alpha-1} \exp\left(\frac{-\ln(x) - \gamma}{\beta} \right)$$

Distribución Burr

Parámetros

k – Parámetro continuo de forma ($k > 0$)

α – Parámetro continuo de forma ($\alpha > 0$)

β – Parámetro continuo de escala ($\beta > 0$)

γ – Parámetro continuo de posición ($\gamma \equiv 0$ para la distribución de tres parámetros de Burr)

Dominio

$$\gamma \leq x < +\infty$$

Función de Densidad de probabilidad de la distribución Burr de 4 parámetros

$$f(x) = \frac{ak \left(\frac{x-\gamma}{\beta} \right)^{\alpha-1}}{\beta \left(1 + \left(\frac{x-\gamma}{\beta} \right)^\alpha \right)^{k+1}}$$

Función de Densidad de probabilidad de la distribución Burr de 3 parámetros

$$f(x) = \frac{ak \left(\frac{x}{\beta} \right)^{\alpha-1}}{\beta \left(1 + \left(\frac{x}{\beta} \right)^\alpha \right)^{k+1}}$$

Distribución Pearson 6

Parámetros

α_1 – Parámetro continuo de forma ($\alpha_1 > 0$)

α_2 – Parámetro continuo de forma ($\alpha_2 > 0$)

β – Parámetro continuo de escala ($\beta > 0$)

γ – Parámetro continuo de localización ($\gamma \equiv 0$ da la función de pearson de tres parámetros)

Dominio

$$\gamma \leq x < +\infty$$

Función de densidad de probabilidad para la función Pearson 6 de cuatro parámetros

$$f(x) = \frac{\left(\frac{(x-\gamma)}{\beta} \right)^{\alpha_1-1}}{\beta B(a_1, a_2) \left(1 + (x-\gamma)/\beta \right)^{\alpha_1+\alpha_2}}$$

Función de densidad de probabilidad para la función Pearson 6 de tres parámetros

$$f(x) = \frac{(x/\beta)^{\alpha_1 - 1}}{\beta B(\alpha_1, \alpha_2) (1 + x/\beta)^{\alpha_1 + \alpha_2}}$$

Distribución Dagum

Parámetros

k – Parámetro continuo de forma ($k > 0$)

α – Parámetro continuo de forma ($\alpha > 0$)

β – Parámetro continuo de escala ($\beta > 0$)

γ - Parámetro continuo de localización ($\gamma \equiv 0$ para la distribución Dagum de tres parámetros)

Dominio

$$\gamma \leq x < +\infty$$

Función de densidad de probabilidad para la distribución Dagum

$$f(x) = \frac{\alpha k \left(\frac{x}{\beta}\right)^{\alpha k - 1}}{\beta \left(1 + \left(\frac{x}{\beta}\right)^\alpha\right)^{k+1}}$$

Distribución Pareto (segundo tipo)

Parámetros

α – Parámetro continuo de forma ($\alpha > 0$)

β – Parámetro continuo de escala ($\beta > 0$)

Dominio

$$0 \leq x < +\infty$$

Función de densidad de probabilidad

$$f(x) = \frac{\alpha\beta^\alpha}{(x+\beta)^{\alpha+1}}$$

Distribución Log-Logistic

Parámetros

α – Parámetro continuo de forma ($\alpha > 0$)

β – Parámetro continuo de escala ($\beta > 0$)

γ – Parámetro continuo de localización ($\gamma \equiv 0$ para la distribución Log-Logistic de dos parámetros)

Dominio

$$\gamma \leq x < +\infty$$

Función de densidad de probabilidad para la función Log-Logistic de tres parámetros

$$f(x) = \frac{\alpha}{\beta} \left(\frac{x-\gamma}{\beta} \right)^{\alpha-1} \left(1 + \left(\frac{x-\gamma}{\beta} \right)^\alpha \right)^{-2}$$

Función de densidad de probabilidad para la función Log-Logistic de dos parámetros

$$f(x) = \frac{\alpha}{\beta} \left(\frac{x}{\beta} \right)^{\alpha-1} \left(1 + \left(\frac{x}{\beta} \right)^\alpha \right)^{-2}$$

Distribución Weibull

Parámetros

α – Parámetro continuo de forma ($\alpha > 0$)

β – Parámetro continuo de escala ($\beta > 0$)

γ – Parámetro continuo de localización ($\gamma \equiv 0$ da la distribución de Weibull de dos parámetros)

Dominio

$$\gamma \leq x < +\infty$$

Función de densidad de probabilidad de la distribución de Weibull de tres parámetros

$$f(x) = \frac{\alpha}{\beta} \left(\frac{x-\gamma}{\beta} \right)^{\alpha-1} \exp \left(- \left(\frac{x-\gamma}{\beta} \right)^\alpha \right)$$

Función de densidad de probabilidad para la distribución de Weibull de dos parámetros

$$f(x) = \frac{\alpha}{\beta} \left(\frac{x}{\beta} \right)^{\alpha-1} \exp \left(- \left(\frac{x}{\beta} \right)^\alpha \right)$$

Distribución Lognormal

Parámetros

σ – Parámetro continuo de forma ($\sigma > 0$)

μ – Parámetro continuo de escala ($\mu > 0$)

γ – Parámetro continuo de localización ($\gamma \equiv 0$ da la distribución de Lognormal de dos parámetros)

Dominio

$$\gamma \leq x < +\infty$$

Función de densidad de probabilidad de la distribución Lognormal de tres parámetros

$$f(x) = \frac{\exp \left(- \frac{1}{2} \left(\frac{\ln(x-\gamma) - \mu}{\sigma} \right)^2 \right)}{(x-\gamma)\sigma\sqrt{2\pi}}$$

Función de densidad de probabilidad para la distribución Lognormal de dos parámetros

$$f(x) = \frac{\exp \left(- \frac{1}{2} \left(\frac{\ln(x-\mu)}{\sigma} \right)^2 \right)}{x\sigma\sqrt{2\pi}}$$

Distribución gaussiana inversa

Parámetros

λ – Parámetro continuo de forma ($\lambda > 0$)

μ – Parámetro continuo de escala ($\mu > 0$)

γ – Parámetro continuo de localización ($\gamma \equiv 0$ da la distribución gaussiana inversa de dos parámetros)

Dominio

$\gamma \leq x < +\infty$

Función de densidad de probabilidad de la distribución gaussiana inversa de tres parámetros

$$f(x) = \sqrt{\frac{\lambda}{2\pi(x-\gamma)^3}} \exp\left(\frac{-\lambda(x-\gamma-\mu)^2}{2\mu^2(x-\gamma)}\right)$$

Función de densidad de probabilidad para la distribución gaussiana inversa de dos parámetros

$$f(x) = \sqrt{\frac{\lambda}{2\pi x^3}} \exp\left(\frac{-\lambda(x-\mu)^2}{2\mu^2 x}\right)$$

Distribución Johnson SB

Parámetros

γ – Parámetro continuo de forma

δ – Parámetro continuo de forma ($\delta > 0$)

λ – Parámetro continuo de escala ($\lambda > 0$)

ζ – Parámetro continuo de localización

Dominio

$\zeta \leq x < \zeta + \lambda$

Función de densidad de probabilidad de la distribución Johnson SB

$$f(x) = \frac{\sigma}{\lambda\sqrt{2\pi(1-z)}} \exp\left(-\frac{1}{2}\left(\gamma + \sigma \ln\left(\frac{z}{1-z}\right)\right)^2\right)$$

donde $z \equiv \frac{x - \zeta}{\lambda}$

Prueba de Kolmogorov-Smirnov

Esta prueba se usa para decidir si una muestra viene de una distribución continua hipotética. Está basada en la función de distribución acumulada. Asume que tenemos una muestra aleatoria x_1, \dots, x_n de alguna distribución con función de distribución acumulada $F(x)$. La función de distribución acumulada se denota por:

$$F_n = \frac{1}{n} [\text{Número de observaciones} \leq x]$$

La estadística de Kolmogorov-Smirnov se basa en la diferencia vertical más grande entre la función de distribución acumulada empírica y la teórica [22].

$$D = \max_{1 \leq i \leq n} \left(F(x_i) - \frac{i-1}{n}, \frac{i}{n} - F(x_i) \right)$$

Hay dos hipótesis

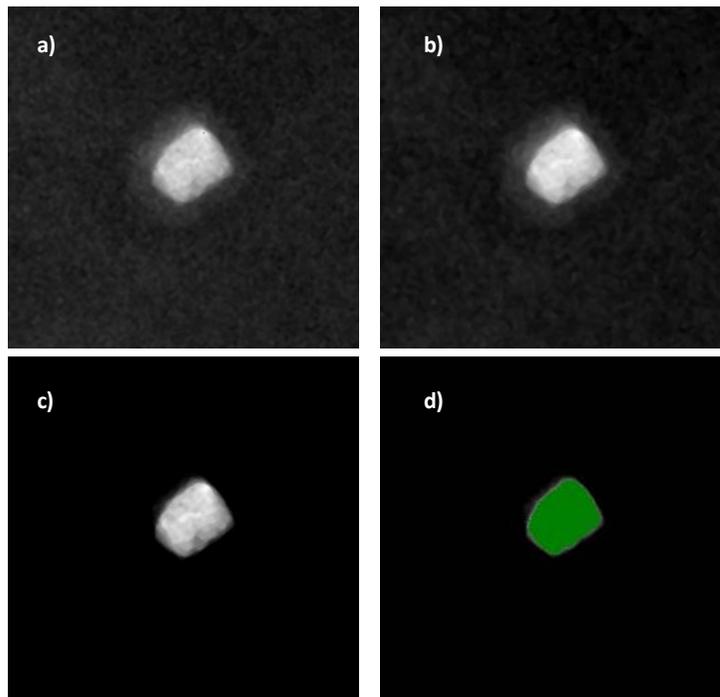
- H_0 : Los datos siguen la distribución especificada.
- H_A : Los datos no siguen la distribución especificada.

La hipótesis se rechaza a un nivel especificado si la estadística de prueba, D , es mayor que el valor crítico. Los valores fijos de α (0.01, 0.05, etc) se usan generalmente para evaluar la hipótesis nulla (H_0). Un valor típico de 0.05 usualmente se usa para la mayoría de las aplicaciones.

Anexo 2: Tratamiento de imágenes.

La granulometría se obtuvo a partir de las imágenes de TEM utilizando para ello el programa Digital Micrograph.

1. Originalmente tenemos una imagen de campo oscuro (figura a). Se utiliza primero un filtro de mediana para disminuir el nivel de ruido en la imagen (figura b).
2. Se descarta información innecesaria en la imagen aplicando la operación matemática Max (figura c).
3. Se elige un nivel de umbral para elegir la información que será utilizada para el análisis de partículas (figura d).



Una vez realizado lo anterior, la imagen está lista para hacer el análisis de partículas y obtener las medidas de largo, ancho y área.