



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN NANOMATERIAL
CERÁMICO DE HIDROXIAPATITA

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:
JOSÉ LUIS CABRERA TORRES

TUTOR PRINCIPAL:

DR. RODRIGO RAFAEL VELÁZQUEZ CASTILLO
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ERIC MAURICIO RIVERA MUÑOZ
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA, CAMPUS UNAM
JURIQUILLA, QUERÉTARO

DR. JUAN ANTONIO GUARDADO PÉREZ
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

MÉXICO, D.F. JUNIO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Resumen

En el presente trabajo se describe el desarrollo de un proceso de obtención de partículas de hidroxiapatita con morfología controlada, donde el tamaño se encuentra dentro del nivel nanométrico. Las nanopartículas obtenidas con formas de: fibra, cinta y placa fueron sintetizadas por medio del método hidrotermal, a través del calentamiento con horno de microondas, bajo ciertas condiciones de reacción, adicionando los siguientes reactivos químicos: nitrato de calcio tetrahidratado, hidróxido de potasio, ácido glutámico, fosfato de potasio monobásico.

Difracción de rayos x, microscopía de alta resolución, espectroscopía de rayos x de energía dispersiva, y algunas técnicas más fueron utilizadas para la caracterización de las nanopartículas resultantes y el análisis del proceso de crecimiento.

Palabras Clave: *Hidroxiapatita, ortofosfatos de calcio, nanofibras, nanopartículas, nanocristales, nanoescala, nanopolvos, nanoestructura, escala nanométrica, nanodimensional, biomateriales, biocerámicos, síntesis por microondas.*

Abstrac

This work describes the development of a process of production of hydroxyapatite particles with controlled morphology, where size is within the nanometer level. The nanoparticles obtained with shapes: fiber, ribbon and plate were synthesized by the hydrothermal method, by heating with microwave, under certain reaction conditions by adding the following chemical reagents: calcium nitrate tetrahydrate, potassium hydroxide, glutamic acid, potassium phosphate monobasic.

X-ray diffraction, high resolution microscopy, spectroscopy, energy dispersive x-ray, and some techniques have been used for the characterization of the resulting nanoparticles and analysis of the growth process.

Keywords: *Hydroxyapatite, calcium orthophosphate, nanofibers, nanoparticles, nanocrystals, nanoscale, nanopowders, nanostructure, nanoscale nanodimensional, biomaterials, bioceramics, microwave synthesis.*

TABLA DE CONTENIDO

Listas de figuras, tablas, imágenes y espectros	ii
Agradecimientos	v
Dedicatorias	vi
Objetivos	1
Capítulo 1: Entorno conceptual	2
a) ¿Qué es la Hidroxiapatita?	2
b) El Tejido Óseo y Dental	7
b.1) Huesos.....	9
b.2) Dientes	11
b.3) La fase mineral: hidroxiapatita, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	12
b.4) Resumen General de Ortofosfatos de Calcio	16
b.5) Información general sobre “nano”	18
b.6) Ortofosfatos de calcio micrométricos vs. Nanométricos.....	20
b.7) La estructura de apatitas nanodimensionales y nanocristalinas	21
Capítulo 2: Metodología, técnicas y materiales utilizados en la preparación de polvos nanométricos de hidroxiapatita	23
Selección de los materiales	23
Método de síntesis	23
Procedimiento utilizado.....	26
Técnicas utilizadas para la caracterización:	29
Espectroscopía infrarroja (FTIR).....	29
Microscopía Electrónica de Barrido con Electrones (SEM y FE-SEM).....	30
Microscopía Electrónica de Transmisión.....	32
Difracción de rayos X de polvos (DRX).....	35
Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	36
Capítulo 3: Resultados y su discusión	38
Descripción de hallazgos obtenidos por la técnica de:	
Microscopía de Barrido con Electrones (SEM).....	38
Microscopía de Barrido con Electrones de Emisión de Campo (FE-SEM)	43
Microanálisis EDS	49
Microscopía de Barrido con Electrones FE-STEM.....	50
Espectroscopía infrarroja (FT-IR)	53
Microscopía Electrónica de Transmisión de alta resolución HRTEM	54
Difracción de rayos X de polvos (XRD)	61
Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	63
Resumen y conclusiones.....	64
Bibliografía	67

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

<i>Figuras número</i>	<i>Página</i>
1.- Siete niveles jerárquicos del esqueleto de pez cebra	10
2.- Átomo de Calcio tipo I y tipo II	12
3.- Tetraedro grupo fosfato y OH	12
4.- Arreglo de átomos calcio tipo II	13
5.- Arreglo de tetraedros de fosfatos	14
6.- Apilamiento de calcio tipo I	15
7.- Arreglo hexagonal de la estructura de calcio tipo II	15
8.- Estructura cristalina de HAp	15
9.- Vaso de teflón	26
10.- Calentamiento por microondas.....	27
11.- Horno de microondas industrial	27
12.- Espectrómetro FT-IR	28
13.- Microscopio electrónico de barrido SEM	30
14.- Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo FE-SEM ...	31
15.- Microscopio de transmisión TEM	32
16.- Rejilla porta muestra para TEM.....	32
17.- Observación de nanoplacas por TEM.....	33
18.- Observación de patrón de difracción de electrones.....	33
19.- Patrón de difracción de electrones	33
20.- Difractómetro de rayos X.....	34
21.- Goniómetro del difractómetro de rayos X	34
22.- Obturador del difractómetro de rayos X	34
23.- Portamuestra del difractómetro de rayos X	34
24.- Equipo Zetasizer Nano S, celda y compartimento	35
25.- Barra de datos del microscopio Hitachi	43

<i>Imagen número</i>	<i>Página</i>
1.- (a, b, c, d) Mezcla de reacción #1 (fibras amorfas)	38
2.- (a, b) Mezcla de reacción #2 (fibras redondeadas)	39
3.- (a, b) Mezcla de reacción #3 (cintas).....	39
4.- (a, b, c, d) Mezcla de reacción #4 (cintas con variedad de tamaños).....	40
5.- (a, b) Mezcla de reacción #5 (cintas y placas)	41
6.- (a, b, c, d) Mezcla de reacción #6 (placas)	42
6.- (e, f) Mezcla de reacción #6 (placas).....	43
7.- (a, a-bis) Mezcla de reacción #6 vista por SE(U)	44
7.- (b, b-bis) Mezcla de reacción #6 vista por SE(L).....	45
7.- (c, c-bis) Mezcla de reacción #6 vista por LA(U).....	46
7.- (d, d-bis) Mezcla de reacción #6 vista por SE+BSE(TU)	47
7.- (e, f) Mezcla de reacción #6 vista por Cold-FE y Schottky-FE.....	48
8.- (a, b) Mezcla de reacción #6 vista por STEM.....	50
8.- (c, d) Mezcla de reacción #6 vista por STEM.....	51
9.- Imagen de nanoplaca vista por HRTEM	55
10.- Imagen de nanoplaca vista por HRTEM	56
11.- Imagen de nanocinta vista por HRTEM	57
12.- Imagen de nanofibra vista por HRTEM	58

<i>Tabla número</i>	<i>Página</i>
I.- Composición del tejido óseo.....	7
II.- Composición del esmalte dental.....	8
III.- Composición de la dentina.....	8
IV.- Composición del cemento.....	8
V.- Composición del hueso alveolar.....	9
VI.- Los actuales ortofosfatos de calcio y sus propiedades principales.....	17
VII.- Formulación de mezclas de reacción y parámetros de preparación	25
VIII.- Relación Ca/P promedio de las nanopartículas de HAp.....	49
IX.- Resultados d los análisis por FT-IR.....	53
X.- Parámetro de medición por DLS	63

<i>Espectro número</i>	<i>Página</i>
1.- Espectro EDS de nanoplacas de HAp.....	50
2 y 3.- Espectros EDS de dientes.....	50
4.- Espectro FT-IR (transmitancia) de nanoplacas de HAP	54
5.- Espectro de Difracción de rayos X de HAp	61
6.- Espectro extendido de Difracción de rayos X de HAp con PDF	62

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar su más sincero agradecimiento a los tutores Dr. Rodrigo Velázquez y el Dr. Eric Rivera por su colaboración en la preparación de este manuscrito. A mis profesores: Dra. Beatriz Marcela Millán Malo; Dra. María Antonieta Mondragón Sosa; Dr. Miguel Ángel Ocampo Mortera; Dr. Todor Halatchev Dimitrov; Dr. Rufino Nava Mendoza; Dr. Luis Miguel Apátiga Castro. Gracias también a todos los integrantes del consejo escolar de CFATA, en especial a la Fís. Rosa Elena López Escalera. También agradezco al Dr. Ricardo Vera y a la Lic. María Esther Carrillo Espinosa, por sus valiosos comentarios, su noble apoyo y gestión administrativa y académica.

Agradezco todo el apoyo por parte del CENAM para mi preparación y superación académica, especialmente al Director del CENAM, Dr. Héctor Nava Jaimes; al director del Área de Metrología de Materiales, Dr. Yoshito Mitani Nakanishi; al jefe de Dirección de Materiales de Referencia Ing. José Antonio Salas Téllez; a la Comisión del Sistema de Desarrollo Profesional (SIDEPRO), Patricia López Cruz y demás integrantes; y manifiesto mi agradecimiento especial al tutor Dr. Juan Antonio Guardado, cuya familiaridad con las necesidades e ideas del programa SIDEPRO del CENAM, resultó de enorme utilidad durante todas las fases del desarrollo de esta tarea.

DEDICATORIAS

Un agradecimiento tanto a mi madre Ma. Elena Torres Garza como a mi abuelita María Luisa Garza Morales, por brindarme tanto motivación como cariño en cada uno de mis proyectos; a mi tío Gustavo Torres Garza por su noble ejemplo y apoyo económico indirecto; un agradecimiento póstumo a mi abuelo Porfirio Torres (q.e.p.d.) porque gracias a su legado, hoy estoy dando un paso más a mi carrera profesional. A mis hermanas Silvia, Mónica y Miriam que me han acompañado en tantas travesuras de niños; a familiares y amigos sinceros que a lo largo de mis estudios estuvieron al pendiente de mi esfuerzo y dieron su apoyo, alegría y consejo en todo momento.

Agradezco a Dios y demás seres divinos que siempre me acompañan, por haberme brindado la oportunidad de salir adelante con su ayuda en cada situación difícil en mi vida, como los que transcurrieron en mis estudios de Maestría, ya que sin Él no hubiera concluido mis estudios, ampliando mi conocimiento y conocido a tantas nuevas buenas personas, y sobre todo conocer a una mujer fabulosa destinada para mí, Raquel Patricia Trejo González, que le da siempre un aire fresco a mi respiración, una luz para buscar mi destino, calor a mis noches de frío, risas y alegrías a mis días aburridos, sabios consejos a mis dudas y en general mucha tranquilidad a mi alma. Gracias a ti también por existir y estar junto a mí!

OBJETIVOS

Dentro de los objetivos generales de esta Tesis de Maestría, se estableció lo siguientes:

- Obtener (en base a la adición química de ciertos reactivos) un material cerámico de Hidroxiapatita con diferentes tipos morfologías y tamaños, en respuesta a los requerimientos actuales en cuanto a su presentación física y tamaño homogéneo a escala preferentemente a nivel nanométrico, así como utilizar diferentes condiciones del proceso productivo (en comparación de otros métodos actuales de síntesis), utilizando para este trabajo el método de síntesis por vía húmeda, a base de calentamiento con horno de microondas industrial.

Objetivos particulares:

- Establecer las condiciones de síntesis que permitan la obtención de morfologías homogéneas de nanofibras, nanocintas y nanoplacas de material cerámico de hidroxiapatita.
- Desarrollar condiciones experimentales adecuadas para la caracterización de los materiales cerámicos de hidroxiapatita resultantes, con el fin de entender la naturaleza del crecimiento de las diferentes morfologías que se obtengan, con el fin de manipular la arquitectura de cristales inorgánicos de materiales cerámicos de la misma naturaleza de la hidroxiapatita a nivel microscópica, pero principalmente a un nivel completamente nanométrico.
- Obtener un candidato idóneo (homogéneo, a nivel nanométrico) para futuras investigaciones y/o aplicaciones biomédicas.

Capítulo 1

ENTORNO CONCEPTUAL

A) ¿QUE ES LA HIDROXIAPATITA?

El término "apatita" se aplica a un grupo de compuestos (no sólo los fosfatos de calcio) con una fórmula general en la forma de $M_{10} (XO_4)_6 Z_2$, donde M^{2+} es un metal y las especies XO_4^{3-} y Z^- son aniones. El nombre particular de cada apatita depende de los elementos o radicales M, X y Z. En estos términos, la hidroxiapatita (HAp) tiene la estructura molecular de la apatita, donde M es el calcio (Ca^{2+}), X es fósforo (P^{5+}) y Z es el radical hidroxilo (OH). Esto se conoce como la hidroxiapatita estequiométrica y su relación atómica Ca/P es 1,67. Su fórmula química es $Ca_{10} (PO_4)_6(OH)_2$, con el 39% en peso de Calcio, 18,5% de fósforo y el 3,38% de OH.

La hidroxiapatita [HAp, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] es uno de los biocerámicos más importantes para aplicaciones médicas y dentales, ya que es el principal constituyente del tejido óseo y dental[1]. Por este motivo, la HAp ha sido ampliamente empleada como biomaterial o como uno de los componentes de biomateriales compuestos, destinados a reparaciones o sustituciones óseas. La HAp puede obtenerse a partir de huesos humanos o de otra especie animal; por transformación de materiales naturales como los esqueletos minerales de los corales y equinodermos: o puede ser sintetizada artificialmente. Dependiendo del origen y del método de síntesis, resultarán materiales con gran variabilidad físico-química y morfológica. Siendo así, pueden obtenerse distintas HAp para satisfacer los requisitos de aplicaciones clínicas específicas. Debido a su composición química, la cual es similar a la parte inorgánica del hueso natural, se ha reportado una excelente habilidad de formación de hueso en muchos modelos experimentales y además, la HAp ha sido desarrollada como un material de andamiaje para el alistamiento de células de hueso asociadas en aplicaciones ingenieriles en el tejido del hueso [2].

La variabilidad en composición química (diferentes fosfatos de calcio), la cristalinidad (entre menor cristalización mayor solubilidad y por tanto su reabsorción

es más factible), el tamaño y morfología (cristales nanométricos presentan una alta reactividad y frecuentemente interactúan con los tejidos a su alrededor de forma distinta a la de los cristales micrométricos) afectan la solubilidad y reactividad de la HAp. Consecuentemente, dependiendo de las condiciones de síntesis, al ser implantada, la HAp puede permanecer estable o ser reabsorbida, ser inerte o enlazarse a los tejidos adyacentes, etc., ampliándose el espectro de propiedades del material [3].

La ciencia de materiales está jugando un creciente rol en las ciencias de bioingeniería y biomédica con el objetivo de desarrollar nuevos sistemas y materiales capaces de superar los ambientes altamente demandantes de un organismo vivo. Uno de esos materiales, la HAp, es el principal material de fosfato de calcio presente en la fase mineral de hueso. El campo de materiales biomédicos ha crecido rápidamente durante los pasados 20 años y ofrece soluciones para reparar defectos, corregir deformidades, reemplaza el tejido dañado y provee terapia. Este campo ha contribuido para incrementar el tiempo de vida promedio de los individuos en países desarrollados. El valor en el mercado de biomateriales está en el orden de billones de dólares anualmente y sigue creciendo conforme nuevos productos ofrecen nuevas soluciones a problemas de salud [4]. Los materiales basados en HAp han sido utilizados para aplicaciones dentales y biomédicas, en donde el control de la morfología y la estructura a nivel de la microescala y nanoescala en la síntesis de procesos, es crucial para sus diversas aplicaciones.

Se ha encontrado que diferentes y jerárquicas estructuras de tejido duro puede ser producido durante procesos de biomineralización y consisten en cristales de HAp con diferentes morfologías. De esta manera, investigadores a nivel mundial se han enfocado en el desarrollo de nuevos métodos de síntesis de HAp tratando de controlar la morfología de esos cristales. Esto es muy importante debido al hecho de que el control de la morfología de las partículas de HAp en los diferentes procesos de síntesis es crucial para diferentes aplicaciones, como por ejemplo en el área de biomateriales. Por otra parte, las características estructurales determinan las propiedades micro y macroscópicas de esos potenciales biomateriales.

El primer método de síntesis de HAp fue descrito en 1851; Daubrée obtuvo HAp por medio del uso de un flujo de vapor de un compuesto químico de fósforo y cloro (PCl_3) sobre cal viva. Desde entonces, diferentes métodos de síntesis han sido reportados, incluyendo síntesis en estado sólido a alta temperatura, síntesis en fase acuosa, métodos hidrotermales entre otros, así como métodos químicos, métodos sol-gel y métodos de recubrimientos de HAp sobre diferentes sustratos por medio de spray con plasma, depositación electroquímica, crecimiento con sales fundidas, crecimiento con gel, etc. En alguno de estos métodos la reacción de síntesis toma lugar dentro de soluciones acuosas y el producto precipita al final de la reacción [5].

La manipulación sistemática de la morfología y arquitectura de cristales inorgánicos en niveles de la microescala y nanoescala es un reto significativo, el cual llama la atención creciente debido a su fuerte influencia en las propiedades del material. Por ejemplo, en procesos de la biomineralización de tejido duro vertebrado, algunas moléculas específicas para el control de la nucleación y crecimiento de cristales inorgánicos de HAp resultan de la formación de estructura jerárquica de dientes y huesos con propiedades mecánicas superiores. Por lo tanto, la síntesis controlada de cristales apatíticos con varias morfologías ha sido el centro de investigación intensiva más allá del interés por el completo entendimiento de biomineralización y utilidad en aplicaciones industriales y biomédicas. Inspirada en la biomineralización, la manipulación molecular de cristales inorgánicos con modificadores de crecimiento orgánicos, gradualmente se desarrolla como una poderosa herramienta para el diseño de materiales originales y novedosos. Actualmente, una variedad de moléculas orgánicas, tales como bromuro hexadeciltrimetilamonio, sulfato docecil de sodio (NaDS), aminoácidos, proteínas, monosacáridos y así sucesivamente, han sido utilizados para sintetizar HAp con morfologías de tipo fibras y tipo escamas. Sin embargo, la fase mineral en tejidos duros de vertebrados calcificados no es HAp estequiométricamente pura, sino que está parcialmente substituida por algunos iones extraños, tales como F^- , CO_3^{2-} , Na^+ , y algunas moléculas orgánicas, los cuales inducen a la fase mineral propiedades especiales[6].

Apatitas biológicas, las cuales son los constituyentes inorgánicos del hueso, diente y dentina, son típicamente muy variables en su composición y morfología y contienen diferentes impurezas (Mg_2^+ , K^+ , Na^+ , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , Cl^- , F^- , etc.). En general, estas apatitas biológicas impuras son designadas como apatitas deficientes de calcio o apatitas no estequiométricas. Algunas Hidroxiapatitas sintéticas son frecuentemente utilizadas como materiales de referencia en biomineralización y en estudios de biomateriales. La composición, propiedades fisicoquímicas, tamaño del cristal y morfología de apatitas sintéticas son extremadamente sensibles a las condiciones de preparación. La incorporación de varios iones como las trazas de impurezas (iones de fosfato hidrogenado, carbonato, silicato, etc.) es muy difícil de prevenir en cualquier procedimiento de preparación de hidroxiapatita. La sinergia estructural entre la HAp y los substratos inorgánicos determinan las sorprendentes propiedades elásticas y mecánicas del tejido óseo. La HAp sintética existe en dos formas estructurales: hexagonal y monoclinica, las cuales tienen unas insignificantes diferencias estructurales. La HAp hexagonal es usualmente formada por la precipitación de soluciones supersaturadas a $25\text{ }^\circ\text{C} - 100\text{ }^\circ\text{C}$ y la HAp monoclinica es primeramente formada a partir de la estructura cristalina hexagonal al someterse a altas temperaturas ($850\text{ }^\circ\text{C}$) en aire y entonces enfriada a temperatura ambiente [7].

La HAp con estructura cristalina hexagonal es la más frecuentemente encontrada, teniendo el grupo de simetría $P6_3/m$, con los parámetros de red de $a = b = 94.32\text{ nm}$ (9.432 \AA), $c = 66.881\text{ nm}$ (6.6881 \AA) y $\gamma = 120^\circ$. Esta estructura consiste en un arreglo de PO_4 tetraédrico sostenido junto con iones de calcio (Ca) esparcidos entre ellos. Los iones de Ca están presentes en dos sitios marcadamente diferentes, en columnas perfectamente alineadas (Ca(I)) y en triángulos equiláteros (Ca(II)) centrados en los ejes de rotación. Los radicales hidroxilo (OH's) están presentes en columnas sobre los ejes de rotación, y los OH's adyacentes apuntan en direcciones opuestas. La HAp también puede existir con estructura cristalina monoclinica, la cual es más ordenada y termodinámicamente más estable, a temperatura ambiente. El grupo espacial para la HAp estequiométrica es $P2_1/b$, y la celda unitaria monoclinica tiene parámetros de red $a = 94.21\text{ nm}$ (9.421 \AA), $b = 2a$, $c = 68.81\text{ nm}$ (6.881 \AA), y γ

= 120°. La mayor diferencia entre la estructura de HAp monoclinica y la estructura de HAp hexagonal es la orientación de grupos hidroxilos. En la estructura monoclinica de HAp, todos los OH's en una columna dada están apuntando en la misma dirección y la dirección contraria en la siguiente columna. Por otro lado, en la HAp hexagonal, el OH adyacente apunta en la dirección opuesta como se mencionó arriba. A pesar de de la similitud entre las HAp monoclinica y hexagonal, sus diferencias estructurales son suficientes para ejercer un fuerte impacto en algunas de sus propiedades fisicoquímicas. Ya que la HAp monoclinica es estructuralmente más estequiométrica que la HAp hexagonal, es predecible que la cinética de disolución y la cinética de difusión a lo largo de la región de la columna de OH será completamente diferente en cada una de estas estructuras cristalinas[8].

Está bien establecido que las formas nanodimensionales y nanocristalinas de los ortofosfatos de calcio pueden imitar tanto la composición como las dimensiones de los componentes constituyentes de tejidos calcificados. Por lo tanto, éstas pueden ser utilizadas en la biomineralización y como biomateriales debido a la excelente biocompatibilidad. Desarrollos más detallados de biomateriales con base de ortofosfato de calcio se verán beneficiados en su mayor parte por la nanotecnología, la cual ofrece excepcionales planteamientos para superar deficiencias de muchos materiales convencionales. Por ejemplo, cerámicos de tamaño nanométrico pueden mostrar una ductilidad significativa antes de fallar contribuida por el tamaño de grano de sus fases. A saber, alrededor de 1987, Karch *et al.* reportó que un cerámico frágil con tamaño de grano nanométrico, podría permitir una gran deformación plástica arriba del 100%. Además, cerámicos nanoestructurados pueden ser sintetizados a bajas temperaturas; por ello los problemas asociados con el sinterizado a altas temperaturas son también disminuidos. Por consiguiente, las formas nanocristalinas y nanodimensionales de biocerámicos claramente representan una prometedora clase de implantes ortopédicos y dentales con mejores propiedades biológicas y biomecánicas [9-página 1976].

B) EL TEJIDO ÓSEO Y DENTAL

Los tejidos duros óseo y dental se componen en general de tejido orgánico que en mayor o menor grado se encuentra mineralizado. Por lo anterior, estos tejidos se han clasificado dentro de lo que en Ciencia de materiales se denomina materiales compuestos. Los materiales compuestos tienen la particularidad de presentar propiedades que no se obtienen en cualquiera de sus componentes por separado. El componente orgánico es una matriz formada por proteínas o polisacáridos o una combinación de ambos. Durante las etapas de desarrollo del tejido, primero se forma la matriz polimérica (que puede ir variando en composición con el tiempo) y posteriormente se mineraliza. En las tablas I, II, III, IV y V se enlistan las composiciones del tejido óseo, esmalte dental, dentina, cemento y hueso alveolar. Se indican la parte orgánica (la matriz biopolimérica) y la parte mineral del tejido. Esta composición varía dependiendo si el tejido está en proceso de calcificación o mineralización, así como de la edad del individuo.

Tabla I Composición del tejido óseo

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

M = componente mayoritario.

(*) La hidroxiapatita carbonatada contiene dentro de su estructura cristalina el grupo carbonato CO_3^{2-} así como otros iones que sustituyen al calcio y al grupo OH^- .

Tabla II Composición del esmalte dental

Componente	% en peso	% en Volumen
Mineral	97	92
Hidroxiapatita carbonatada $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, cristales: prismas hexagonales de 100-1000 nm × 30-70 nm × 10-40 nm.	M	
Orgánico	1	2
Amelogenina (25 kDa), 90% de la materia orgánica		
Enamelina (70 kDa)	M	
Tuftelina (50-70 kDa) y Sialofosfoproteína dentinaria		
Ameloblastina o Amelina		
Proteínas séricas		
Condroitín 4 sulfato		
Condroitín 6 sulfato		
Lípidos		
Fibronectina o similar (en esmalte inmaduro)		
Agua	2	6

M = componente mayoritario.

Tabla III Composición de la dentina

Componente	% en peso	% en Volumen
Mineral	70	45
Hidroxiapatita carbonatada, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, cristales de 36 nm x 25 nm x 10 nm.	M	
<i>Predentina</i> : calcificación con muy baja cristalinidad		
<i>Dentina del manto</i> : calcificación lineal		
<i>Dentina circumpulpar</i> : calcificación globular (calcosferitas)		
Orgánico	20	33
<i>Predentina</i> (capa de 10-40 μm de espesor, cercana a la pulpa)	M	
Colágenas tipo I, V y VI (red fibrilar). Tipo III solo al inicio.		
Proteoglicanos (principalmente condroitín 6 sulfato)		
<i>Dentina del manto</i> (20 μm de espesor, cercana a esmalte)		
Colágena tipo I (fibras de Von Korff)		
Glucosamino-glicanos, GAG (Condroitín 4 sulfato y 6 sulfato)	M	
Fibronectina (desaparece al comenzar la mineralización)		
<i>Dentina circumpulpar</i> (calcosferitas, d ~ 3-50 μm)		
Colágena tipo I (fibrillas más delgadas)		
Proteoglicanos (condroitín 4 sulfato, condroitín 6 sulfato)		
Fosforina dentinaria (DPP)	M	
Proteínas Gla (aminoácidos "Gla")		
Agua	10	22

M = componente mayoritario.

Tabla IV Composición del cemento

Componente	% en peso
Mineral	46-50
Hidroxiapatita carbonatada, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, (cristales en forma de prismas hexagonales, los cristales son de menor tamaño que en esmalte y dentina)	M
Carbonatos de calcio	
Oligoelementos: sodio, potasio, hierro, magnesio, azufre y flúor.	
Orgánico	22
Colágena tipo I (~ 90%)	
Proteoglicanos	
Glicosaminoglicanos	M
Glicoproteínas	
Agua	32

M = componente mayoritario.

Tabla V Composición del hueso alveolar

Componente	% en peso
Mineral Hidroxiapatita carbonatada, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (los cristales son de menor tamaño que en esmalte y dentina) carbonatos de calcio (~15%) Otras sales minerales (~5%)	60
Orgánico Colágena tipo I (~90%) Proteoglicanos Glicosaminoglicanos Glicoproteínas	20
Agua	20

M = componente mayoritario.

b.1 Huesos

El hueso es el tejido calcificado más típico de mamíferos y viene en todas clases de formas y tamaños en orden para efectuar varias funciones de protección y soporte mecánico para el cuerpo. El mayor componente inorgánico del mineral del hueso es una apatita biológica, la cual puede ser definida como una CDHA pobremente cristalina (casi amorfa), no estequiométrica y substituida por iones. Desde el punto de vista del material, el hueso puede ser considerado con un ensamble de distintos niveles de siete unidades estructurales jerárquicas desde la macro-micro y nanoescala (Figura 1) para cumplir con numerosas funciones. Además, todos estos niveles de huesos permanentemente interactúan con células y macromoléculas biológicas. En el nivel nanoestructural, cristales tipo placa diminuta de apatita biológica en hueso están presentes dentro de espacios discretos dentro de diminutas fibras de colágeno y crecen con una orientación cristalina específica a lo largo de los ejes c , los cuales son aproximadamente paralelos a los ejes largos de las diminutas fibras de colágeno. Las moléculas de colágeno Tipo I son auto-ensambladas en fibras diminutas con una periodicidad de distancia aproximada de 67 nm y 40 nm entre los extremos de sus moléculas, en las cuales los nanocristales de apatita son colocados. Un compuesto de estos dos constituyentes forma fibras mineralizadas. Las fibras también pueden ser enlazadas de forma cruzada, lo cual provee un alto sistema dinámico idóneo de modificación a causa de la selección de diferentes aminoácidos dando lugar a diferentes propiedades mecánicas para diferentes aplicaciones de biomateriales. Es por esto que el hueso es denominado como un compuesto de fibra reforzado de un origen biológico, en el cual inclusiones duras de tamaño nanométrico están embebidas dentro de una matriz de proteína suave. No obstante, las dimensiones de

cristales de apatita biológicas reportadas en la literatura varían debido a los diferentes métodos de tratamiento y a las técnicas analíticas, estas dimensiones están generalmente alrededor de niveles nanométricos con valores en los intervalos de 30-50 nm (longitud), 15-30 nm (ancho) y 2-10 nm (espesor). ¿Por qué la escala nanométrica parece ser tan importante para los huesos? Recientemente fue demostrado que los nanocompuestos naturales exhiben una estructura mecánica genérica, en la cual las partículas minerales de tamaños nanométricos aseguran la resistencia óptima y máxima tolerancia a la fisuración. Además, la apatita nanodimensional tiene otra función crucial para el organismo. Este es un inmenso depósito de iones de calcio y ortofosfatos necesario para una amplia variedad de funciones metabólicas, el cual ofrece o consume iones de calcio y ortofosfatos por el llamado proceso de “remodelado” a causa de una continua resorción y formación de apatita nanodimensional por osteoclastos y osteoblastos, respectivamente, en un delicado equilibrio [9-página 1982].

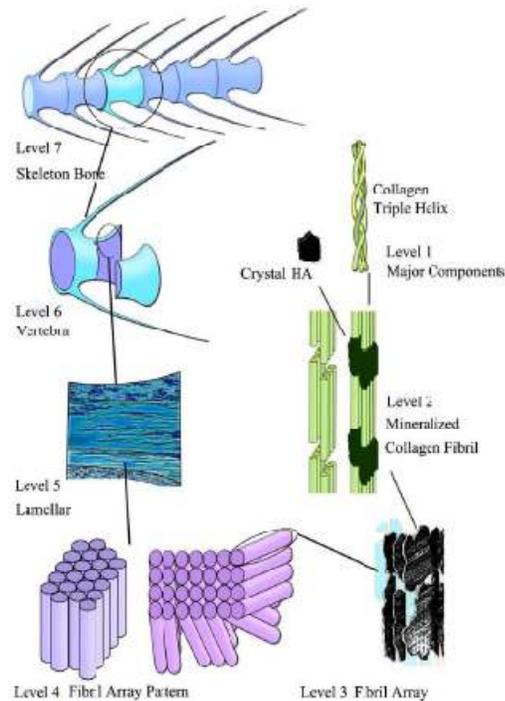


Figura 1.- Siete niveles jerárquicos de organización del esqueleto de pez cebra. Nivel 1: Cristales aislados y parte de las diminutas fibras de colágeno con una estructura de triple hélice. Nivel 2: Diminutas fibras de colágeno. Nivel 3: El arreglo de las diminutas fibras de colágeno mineralizadas con una periodicidad del estriado cruzado de aproximadamente 60-

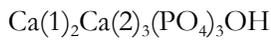
70 nm. Nivel 4: Dos patrones de arreglo de diminutas fibras organizadas como las encontradas en el hueso del esqueleto del pez cebra. Nivel 5: La estructura laminar en una vértebra. Nivel 6: Una vértebra. Nivel 7: Hueso del esqueleto.

b.2 Dientes

Los dientes son otro tejido normal calcificado basado en ortofosfatos de calcio en los vertebrados. A diferencia del hueso, los dientes consisten en al menos dos diferentes biominerales: el *esmalte dental* (la corona, la parte superior de la línea de la encía) y la *dentina* (raíz, la parte por debajo de la línea de la encía). El *esmalte dental* contiene cerca de 98% de apatita biológica, aproximadamente el 1% de compuestos bioorgánicos y alrededor de 2% de agua. El esmalte está compuesto de cristales de apatita en forma de barra que miden de 25 a 100 nm y una longitud de 100 nm a 100 μm o aún más largas, en la dirección del eje c. En el *esmalte dental*, los nanocristales de apatita biológica forman al principio nanofibras minerales; las nanofibras se alinean en forma longitudinal, juntándose y formando fibras diminutas y más tarde forman fibras más gruesas; además, prismas se forman de estas fibras. En la microescala, los prismas son ensamblados dentro de bandas formando diferentes arreglos a través de la capa más delgada del esmalte. Estas características composicionales y estructurales otorgan propiedades especiales al esmalte tales como módulos elásticos anisotrópicos, propiedades viscoelásticas efectivas, mucha más resistencia a la fractura y una relación esfuerzo-deformación más similar a los metales que a los cerámicos. La *dentina* contiene aproximadamente 50% de apatita biológica, aproximadamente 30% de compuestos bioorgánicos y aproximadamente 20% de agua. En la *dentina*, los bloques de construcción nanodimensionales (aproximadamente 24 nm de ancho, 4 nm de espesor y 35 nm de longitud) de apatita biológica son más pequeños que en el esmalte. La dentina es semejante al hueso en muchos aspectos, por ejemplo, posee composición similar y una estructura jerárquica hasta el nivel de membrana del hueso [9-página 1984].

b.3 La fase mineral: hidroxiapatita, $Ca_5(PO_4)_3OH$...[10]

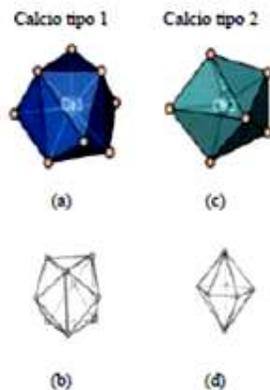
A fin de distinguir los diferentes componentes estructurales en la hidroxiapatita $Ca_5(PO_4)_3OH$, es conveniente reescribir su fórmula química como:



Donde se ha usado la notación Ca(1) y Ca(2) para indicar átomos de calcio tipo 1 y tipo 2 respectivamente. Esta división del calcio en dos tipos se debe a que se encuentran rodeados por un número distinto de oxígenos en la estructura de la apatita (ver figura 2).

El fósforo por su parte, está rodeado de 4 oxígenos (lo que le otorga su número de coordinación) y forma un tetraedro que es representativo del grupo fosfato PO_4^{3-} (figura 3 izquierda). Por último, el grupo OH^{-1} tiene una densidad de carga con simetría casi esférica (figura 3 derecha).

Figura 2



(a, b) Átomo de calcio tipo 1 rodeado de 9 átomos de oxígeno cuya figura geométrica es la distorsión de un prisma triangular triapuntado. (c, d) El átomo de calcio tipo 2 está rodeado de 7 aniones representando distorsiones de una bipirámide pentagonal ideal. El calcio tipo 1 tiene un número de coordinación de 9 y el calcio tipo 2 de 7.

Figura 3



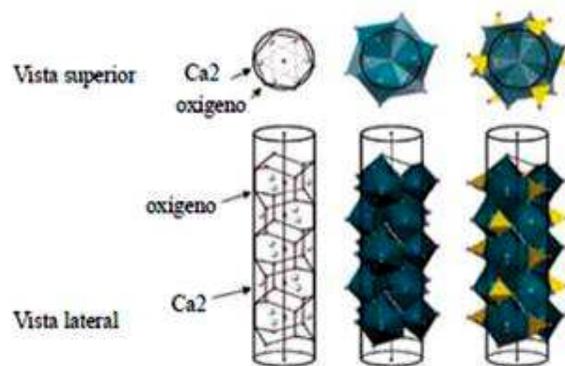
Izquierda: átomo de fósforo rodeado de 4 átomos de oxígeno formando el arreglo en tetraedro del grupo fosfato, PO_4^{3-} . El número de coordinación del fósforo es 4.
Derecha: grupo OH^{-1}

La estructura cristalina de la hidroxiapatita se obtiene ensamblando todas las “piezas” de la estructura (figuras 2 y 3), es decir, los prismas trigonales

triapuntados de Ca(1), las bipirámides pentagonales de Ca(2), los tetraedros de los grupos fosfato y los grupos OH^{-1} .

Los grupos OH^{-1} se disponen en una columna, orientados desordenadamente hacia arriba o hacia abajo a lo largo del eje de un cilindro (figura 4a). Sobre la superficie del cilindro de esa misma figura, se tiene un arreglo hexagonal de átomos de oxígeno. Los átomos de calcio tipo 2 están ubicados un poco desplazados del centro de cada hexágono (figura 4a).

Figura 4



(a) Malla hexagonal de oxígenos sobre una superficie cilíndrica. Los grupos OH^{-1} (desordenados en su orientación con el hidrógeno hacia arriba o hacia abajo) están sobre el eje del cilindro y los Ca2 (esferas blancas) están un poco desplazados del centro de cada hexágono.

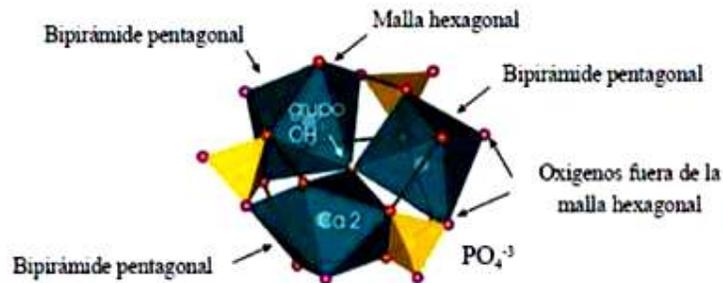
(b) bipirámides pentagonales con el vértice de una pirámide sobre el eje del cilindro (el oxígeno de un grupo OH^{-1}). Cuatro de los siete aniones de la bipirámide pentagonal forman parte de la malla hexagonal de oxígenos.

(c) Tetraedros de grupos PO_4^{-3} con dos de sus oxígenos formando parte de la malla hexagonal y los otros dos proyectados hacia fuera del cuerpo del cilindro.

Con esta descripción, es posible imaginar los grupos OH^{-1} con una cierta posibilidad de moverse a lo largo del eje del cilindro. La carga -1 del grupo OH debe viajar entonces bajo las fuerzas de interacción de cargas negativas -2 (los oxígenos de la malla hexagonal) y cargas positivas $+2$ (de los calcio tipo 2) un poco desplazados del centro de cada hexágono en la malla (figura 4a). Como se verá más adelante, las propiedades de conductividad iónica de la apatita tendrán que ver con el movimiento de los grupos OH^{-1} u otros iones que los puedan sustituir en sus sitios.

Los 7 aniones más cercanos al calcio tipo 2 que forman la bipirámide pentagonal son: el oxígeno del grupo OH^{-1} que se encuentra en el eje del cilindro, cuatro oxígenos que forman parte de la malla hexagonal, y otros dos más que se encuentran fuera del cuerpo del cilindro (figura 4b). Los tetraedros PO_4^{-3} se colocan de tal manera que cada uno de ellos une dos bipirámides pentagonales de $\text{Ca}2$ compartiendo una arista con una y un vértice con la otra (figuras. 4c y 5).

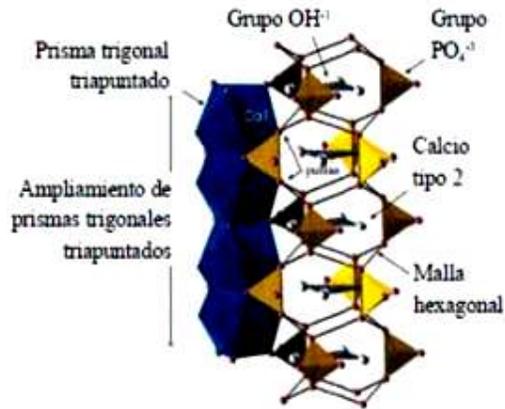
Figura 5



Tetraedros PO_4^{-3} compartiendo sucesivamente aristas y vértices con bipirámides pentagonales de calcio tipo 2.

Los calcio tipo 1, como se mencionó anteriormente, forman prismas triangulares triapuntados (fig. 4a). Estos prismas se ubican en la estructura de la hidroxiapatita de tal manera que se apilan uno sobre otro compartiendo las caras que son las tapas del prisma trigonal. En la figura 6 se muestra este apilamiento.

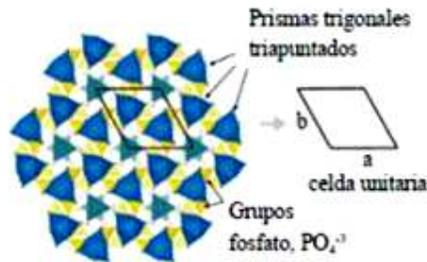
Figura 6



Apilamiento de prismas triangulares tripuntados que corresponden a calcio tipo 1. Los tetraedros de los grupos fosfato están dispuestos de tal manera que una de sus aristas forma parte del borde de una cara que comparten dos prismas triangulares tripuntados apilados uno con el otro; mientras que otra arista se encarga de unir las dos “puntas” de esos mismos dos prismas. Todas las “puntas” de los prismas triangulares son oxígenos que forman a su vez una malla hexagonal cilíndrica como la representada en la figura 4a.

En la figura 7 se puede apreciar el arreglo en conjunto de toda la estructura y su simetría hexagonal. En la figura 8 se observa la celda unitaria de la HAp.

Figura 7



El apilamiento de los prismas triangulares tripuntados correspondientes a calcio tipo 1 de la figura 6 se muestra con la dirección de apilamiento perpendicular al plano de la figura. A la derecha se muestra la celda unitaria del arreglo hexagonal de la estructura.

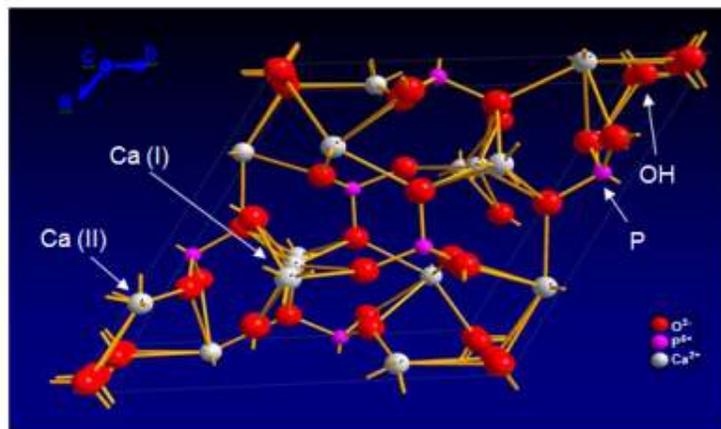


Figura 8: Estructura cristalina de HAp

b.4 Resumen General de Ortofosfatos de Calcio

La principal fuerza motivadora detrás del uso de ortofosfato de calcio como material sustituto de hueso, es su similitud química del componente mineral de huesos y dientes de mamíferos. Como resultado adicional, al ser no tóxico es biocompatible, no reconocido como un material extraño en el cuerpo y más importante, exhibe un comportamiento bioactivo y de integración dentro del tejido vivo, para el mismo proceso activo en la remodelación del hueso saludable. Esto conduce a un vínculo íntimo fisicoquímico entre los implantes y el hueso, expresado como osteointegración. Es más, ortofosfatos de calcio son también conocidos como soporte de adhesión de osteoblastos y su proliferación. Aun así, las mayores limitaciones para usar ortofosfatos de calcio como biomateriales de soporte son sus propiedades mecánicas; es decir, son frágiles con una pobre resistencia a la fatiga. La pobre propiedad mecánica es todavía más evidente para cerámicos altamente porosos y de andamiaje, porque la porosidad más grande de 100 μm es considerada como un requerimiento para una vascularización apropiada y colonización de células del hueso. Por esto, en aplicaciones biomédicas los ortofosfatos de calcio son usados primeramente como materiales de relleno y recubrimiento.

La lista completa de ortofosfatos de calcio conocidos, incluyendo su abreviación estándar y sus mejores propiedades, está dada en la tabla VI.

Tabla VI. Los actuales ortofosfatos de calcio y sus propiedades principales[*]

Relación Ca/P	Compuesto	Fórmula Química	Solubilidad 25 °C, g/L	Intervalo de estabilidad de pH en soluciones acuosas a 25 °C
0.5	Fosfato de monocalcio monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	~18	0.0-2.0
0.5	Fosfato monocalcio anhidro (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	~17	[c]
1.0	Fosfato dicalcio dihidratado (DCPD), mineral brusita	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	~0.088	2.0-6.0
1.0	Fosfato dicalcio anhidro (DCPA), mineral monetita	CaHPO_4	~0.048	[c]
1.33	Fosfato octacalcio (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	~0.0081	5.5-7.0
1.5	Fosfato a-tricalcio (a-TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	~0.0025	[a]
1.5	Fosfato b-tricalcio (b-TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	~0.0005	[a]
1.2-2.22	Fosfato de calcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $n=3-4.5$; 15-20% H_2O	[b]	5-12[d]
1.5-1.67	Hidroxiapatita deficiente de calcio (CDHA) [e]	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ [f] ($0 < x < 1$)	0.0094	6.5-9.5
1.67	Hidroxiapatita (HAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	~0.0003	9.5-12
1.67	Fluorapatita (FA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	~0.0002	7-12
2.0	Fosfato tetracalcio (TTCP), mineral Hilgenstockita	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	~0.0007	[a]

[a] Estos compuestos no se puede precipitar a partir de soluciones acuosas.

[b] No se puede medir con precisión. Sin embargo, los valores se encontraron los siguientes: 25.7 ± 0.1 (pH = 7.40), 29.9 ± 0.1 (pH = 6.00), 32.7 ± 0.1 (pH = 5.28).

[c] Estable a temperaturas por encima de 100 °C.

[d] Siempre metaestable.

[e] En ocasiones, CDHA es nombrado como HA precipitado.

[f] En el caso $x = 1$ (la condición de frontera con Ca/P = 1,5), la fórmula química de CDHA es el siguiente: $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$.

[*]Referencias:

- Dorozhkin, S. V. *Calcium orthophosphates. J. Mater. Sci.* 2007, 42, 1061-1095.

- Dorozhkin, S. V. *Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. Materials* 2009, 2, 399-498.

b.5 Información general sobre “nano”

El prefijo con el nombre “nano” (simbolizado con la letra “n”) específicamente significa una medición de 10^9 unidades. Aunque es ampliamente aceptado que el prefijo “nano” se refiere a 10^9 unidades, en el contexto de materiales nanocristalinos y nanométricos, las unidades deberían referirse específicamente a sus dimensiones, antes que cualquier otra unidad de medida científica. Reciente en una amplia discusión, dentro del marco de trabajo de definiciones, fue presentada a la comisión europea, en donde la nanoescala ha sido definida como aquella que existe en el orden de cien nanómetros (100 nm) o menos. Similarmente, un nanomaterial ha sido definido como “cualquier forma de un material que está compuesto por partes discretas funcionales, donde muchas de las cuales tienen una o más dimensiones en el orden de 100 nm o menos”. Otras definiciones lógicamente resultan de este planteamiento, por ejemplo:

- ❖ un materia nanocristalino es “un material que está constituido de muchos cristales, la mayoría de los cuales tienen una o más dimensiones en el orden de 100 nm o menos” (normalmente, con la presencia de ningún cristal de tamaño micrométrico ni una fase amorfa intergranular) y
- ❖ un nanocompósito es un “material multifase en el cual la mayoría de los componentes de la fase dispersa tiene una o más dimensiones en el orden de 100 nm o menos”.

Similarmente, materiales nanoestructurados son definidos como los materiales que contienen elementos estructurales (por ejemplo grupos de partículas, cristalitas o moléculas) con dimensiones en el intervalo de 1 a 100 nm, nanorecubrimientos representan recubrimientos superficiales con capas individuales o multicapas de 1-100 nm de espesor, nanopolvos son polvos extremadamente finos con un tamaño de partícula promedio en el intervalo de 1-100 nm y las nanofibras son fibras con un diámetro dentro de 1 a 100 nm. De acuerdo a su geometría, todos los nanomateriales pueden dividirse en tres categorías principales: 1) formas equiaxiales, 2) unidimensionales (o fibras) y 3) bidimensionales (laminar). En general es

importante notar que en la literatura de ortofosfatos de calcio hay casos, cuando el prefijo “nano” ha sido aplicado para las estructuras, con dimensiones mínimas sobrepasando 100 nm. Como una regla, nanomateriales ingenieriles pueden ser manufacturados de casi cualquier sustancia. De crucial importancia, hay dos características importantes que confieren las propiedades especiales para cualquier nanomaterial; estas son los efectos cuánticos asociados con las dimensiones muy pequeñas (actualmente, esto no es aplicable para el campo de biomateriales) y una grande relación superficie/volumen que es encontrada a esas dimensiones. Por ejemplo, las áreas superficiales específicas de partículas micrométricas son típicamente de 60-80 m²/g, mientras que el diámetro de partícula decreciente a décimas de nanómetro incrementa el área específica superficial arriba de cinco veces más, una cantidad asombrosa de área superficial por masa! Por otra parte, todos los materiales con nanofases tienen propiedades únicas superficiales como un número mayor de límites de grano y defectos en la superficie, una enorme área superficial y estructura electrónica alterada, si son comparados con materiales micrométricos. Mientras menos de aproximadamente 1% de átomos de micropartículas ocupa la posición superficial, decenas de átomos en una partícula de 10 nm de diámetro habitan en su superficie y aproximadamente el 60% en una partícula de 2 nm. Está muy grande relación superficie/volumen de nanomateriales provee una tremenda fuerza impulsora para difusión, especialmente a elevadas temperaturas, así como causa una auto-agregación en partículas largas. Además, la solubilidad de muchas sustancias incrementa con la disminución del tamaño de partícula. Lo que es más, materiales con nanofase pudieran tener características superficiales (por ejemplo, una cantidad importante de poros a nanoescala) para influenciar el tipo y número de absorción de proteínas selectivas que pudieran intensificar una específica adhesión de osteoblasto. Finalmente y sin embargo importante, materiales nanodimensionales y nanocristalinos tienen diferentes propiedades mecánicas, eléctricas, magnéticas y ópticas si se comparan con materiales con tamaño de grano grande de la misma composición química. Los materiales nanoestructurados pueden tomar la forma de polvos, dispersiones, recubrimientos o materiales de aporte. En general, los materiales nanoestructurados contienen una gran fracción de volumen (mayor que

50%) de defectos tales como límites de grano, dislocaciones, las cuales influyen fuertemente sus propiedades químicas y sus propiedades físicas. Las grandes ventajas de la nanoestructura fueron primeramente el entendimiento en la industria electrónica con el advenimiento de procesos de deposición de películas delgadas. Otras áreas de aplicación la han seguido, por ejemplo, biocerámicos nanoestructurados han mejorado problemas de fricción y desgaste asociados con la unión de componentes de replazo, porque estos fueron más duros que biocerámicos de grano grueso. Por otra parte, las nanoestructuras han permitido la homogeneidad química y la uniformidad estructural en un grado, el cual fue se creía alguna vez que esta imposible de alcanzar. En biocerámicos de ortofosfatos de calcio, el mayor objetivo e la nanoestructura es imitar la arquitectura de huesos y dientes [9, pp 1979-1980].

b.6 Ortofosfatos de calcio MICROMÉTRICOS vs. NANOMÉTRICOS

Los polvos biocerámicos de ortofosfato de calcio de tamaño micrométrico sufren de una pobre sinterización, principalmente debido a una baja área de superficie (típicamente 2-5 m²/g), mientras que el área de superficie de ortofosfatos de calcio nanodimensional excede 100 m²/g. En adición, el proceso de resorción de ortofosfatos de calcio sintéticos micrométricos, se encontró que es muy diferente que el del mineral del hueso. Aunque las características de ortofosfatos de calcio naturales nanodimensionales y nanocristalinos (de huesos y dientes), se han conocido con mucha anterioridad, la historia de las investigaciones sistemáticas de este campo ha comenzado apenas en 1994. A saber, una cuidadosa búsqueda en bases de datos científicas, utilizando varias combinaciones de palabras clave “nano” + “fosfatos de calcio”, “nano” + “apatita”, “nano” + “hidroxiapatita”, etc., dentro del título de artículos reveló cinco publicaciones en 1994. Publicaciones anteriores a 1994 con las palabras clave antedichas no se encontraron en sus títulos.

HAp nanodimensional (con tamaño aproximado de 67 nm) se encontró que tiene una alta rugosidad superficial de 17 nm, si es comparada con un el valor de rugosidad de 10 nm para una HAp microdimensional (con tamaño aproximado de 180 nm), mientras que los valores de ángulo de contacto (una medición cuantitativa

del mojado de un sólido por un líquido) fue significativamente menor para la HAp nanométrica (6.1) si es comparada con la HAp micrométrica (11.51). Adicionalmente, el diámetro de poros individuales en la HAp nanodimensional densa, que es varias veces más pequeña (diámetro de poro de aproximadamente 0.66 nm) que la de HAp microdimensional densa (diámetro de poro de aproximadamente de 0.198 – 3.1 nm). Se sabe que una superficie rugosa incrementa las funciones del osteoblasto mientras que una estructura porosa mejora la osteoinducción, comparado con superficies lisas y estructuras no porosas, respectivamente. En general, los biomateriales nanoestructurados presentan un desempeño mucho mejor que sus contrapartes, con partículas de tamaños grandes, debido a su vasta relación superficie/volumen y su inusual efecto químico sinérgico. Tales sistemas nanoestructurados constituyen un puente entre las moléculas simples y la matriz del material. Una razón más a todo esto, es que HAp nanométrica también se espera que tenga una mejor bioactividad que aquella con cristales gruesos. Obviamente, la fracción volumétrica de límites de grano en ortofosfatos de calcio nanométricos es incrementada significativamente preponderante para una adhesión de osteoblastos mejorada, proliferación y mineralización. Por lo tanto, una nanocomposición de estos biomateriales emula la organización jerárquica del hueso, para iniciar el crecimiento de una capa de apatita y para dar lugar a la respuesta celular y de tejido en el remodelamiento del hueso. Estos ejemplos enfatizan que materiales con nanofase son dignos de mayor atención en perfeccionar cierto tipo de falla en implantes ortopédicos. Sin embargo, todos los materiales de tamaño nanométricos tienden a aglomerarse y para evitar la auto segregación de nanopartículas de ortofosfatos de calcio [9, pp. 1980-1981].

b.7 La estructura de apatitas nanodimensionales y nanocristalinas

Debido a la estructura apatítica en tejidos naturales calcificados, las apatitas parecen ser en los compuestos mejor investigados entre los ortofosfatos de calcio disponibles (ver tabla VI). Por consiguiente, las apatitas nanodimensionales y nanocristalinas han sido estudiadas concienzudamente por varias técnicas físico-químicas y métodos de análisis químico, con especial consideración al efecto “nano” (esto es, una

contribución intensificada de la superficie con respecto al volumen). Debido a la naturaleza nanocristalina, varias técnicas de difracción no han dado mucha información todavía en los detalles de la estructura fina relacionada con nanocristales de apatita (ensambles de nanopartículas dan solo patrones anchos de difracción, similares a un material amorfo). A pesar de esto, estudios de microdifracción con microsondas de electrones de 35 ± 10 nm de diámetro claramente indican una característica cristalina de las nanopartículas en esos ensambles. Por otra parte, los resultados de la microscopía de transmisión de alta resolución revelan que nanopartículas de HAp se comportan como una estructura de grano monocristalino fino. Por lo tanto, progresos recientes en la estructura de apatitas nanodimensionales y nanocristalinas han dependido principalmente en diversos métodos espectroscópicos, los cuales son sensibles a la perturbación de ambientes cerrados de varios iones. A saber, el análisis de la estructura reveló una existencia de desorden estructural en la superficie de la partícula, el cual ha sido explicado por interacciones químicas entre los grupos ortofosfatos y moléculas de agua absorbidas ó grupos hidroxilo localizados en la superficie de nanopartículas de apatita. Más en este sentido, el espectro infrarrojo (FTIR) de apatitas nanocristalinas, en el dominio ν_4 PO_4 , revela la existencia de bandas adicionales de iones ortofosfato los cuales no pueden ser asignados a una parte experimental.

Capítulo 2

METODOLOGÍA, TÉCNICAS Y MATERIALES UTILIZADOS EN LA PREPARACIÓN DE POLVOS NANOMETRICOS DE HIDROXIAPATITA

La preparación de cerámicos de calcio y fosfato por medios convencionales es tediosa y consume tiempo [4]. La síntesis de materiales a través de métodos hidrotérmicos asistidos por microondas ofrece las ventajas de proporcionar un calentamiento homogéneo durante todo el volumen y una muy eficiente transformación de energía [5]. Los tiempos de reacción son más cortos que los requeridos convencionalmente para producir muestras que tienen patrones de rayos X similares [6]. A pesar de que todavía está en una etapa temprana de desarrollo, la síntesis de materiales cerámicos por microondas ofrece muchas nuevas y excitantes oportunidades [7]. Hoy día la síntesis por microondas es comúnmente usada en cerámicos estructurales [8-10], cerámicos electrónicos [11-13] y raramente en biomateriales [14,15].

SELECCIÓN DE MATERIALES

Acido glutámico [$C_5H_9NO_4 \cdot H_2O$] (SIGMA G1126)

Nitrato de calcio tetrahidratado [$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$] (Sigma Ultra C4955)

Fosfato de potasio monobásico [KH_2PO_4] (Electron Microscopy Sciences 20250)

Hidróxido de potasio [KOH] (SIGMA-ALDRICH 221473)

Agua desionizada.

MÉTODO DE SÍNTESIS: VÍA HIDROTÉRMAL CON CALENTAMIENTO CON MICROONDAS

El método, particularmente utilizado en este desarrollo de síntesis por método hidrotérmico asistido por microondas, consiste en promover la formación de hidroxiapatita a partir de disoluciones acuosas a temperatura alrededor de 160 °C, debido a las limitaciones de resistencia y durabilidad de los recipientes. Para alcanzar tal temperatura sin permitir la evaporación del solvente, la presión también es

elevada y controlada. De este modo, la presión resultante es simplemente la presión de vapor del solvente a la temperatura deseada. La reacción de hidroxiapatita se realizó en horno de microondas, en vasos de teflón presurizables (ver figuras 9 y 10) para tratar cualquier imprevisto durante la preparación de la muestra. El utilizar este método de reacción nos permite tener más control y seguridad durante su preparación, ya que el horno de microondas contiene un sensor de presión de seguridad y sensor de control de temperatura que ofrece al operador múltiples niveles de seguridad. El sistema de preparación por microondas se espera que pueda ser usado para conveniencia, economía y uso libre de problemas.

Características del método particularmente utilizado:

- Preparación de muestra rápida y económica.
- Características de seguridad multinivel.
- Control de presión y control de temperatura en forma precisa.
- Uso de varios vasos de digestión para Microondas.
- Consumo mínimo de Voltaje de 950 watts.
- La tecnología del Microondas reduce significativamente el tiempo de preparación de la muestra y mejora la precisión de análisis.
- Permite obtener gráficos en tiempo real y adquisición de datos de los parámetros de temperatura y presión para monitorear las condiciones de reacción de la muestra.
- Tiene etapas programables de los puntos de control de la Presión y la Temperatura para repetir su programación en futuras preparaciones.
- Plataforma de rotación reversible que asegura la absorción de energía uniforme de hasta 12 muestras durante una corrida.
- Selección de vasos de presión moderada de aproximadamente 1380 kPa (200 psi).

El procesamiento hidrotermal puede definirse como cualquier reacción heterogénea en presencia de disolventes (ya sean acuosos o no acuosos) bajo alta presión y temperatura, para disolver y recristalizar (recuperar) los materiales que son relativamente insolubles en condiciones ordinarias. La definición de la

palabra hidrotermal ha sufrido varios cambios desde el significado original de las palabras griegas 'hydros' que significa agua y 'thermos' significa calor. Recientemente, Byrappa y Yoshimura han definido a la reacción hidrotermal como cualquier reacción química heterogénea en presencia de un disolvente (acuoso o no acuoso) por encima de la temperatura ambiente y a presión mayor que 101.325 kPa (1 atm) en un sistema cerrado [1]. Para la síntesis de la HAp por vía hidrotermal, se adoptó la ruta seguida por la referencia[1], con la variante de que el calentamiento se realizó entre 150 y 160 °C por medio de horno de microondas y la reacción se logró con vasos presurizados de teflón a una presión de 690 kPa (100 psi).

Como materiales de partida se han usado ciertas cantidades de los reactivos químicos, de acuerdo al modelo de reacción indicado en la tabla VII.

Tabla VII. Formulación de las mezclas de reacción, así como los parámetros de la preparación de los productos: nanofibras, nanocintas y nanoplacas

Mezcla de Reacción #	C _G (g)	C _{Ca} (g)	C _P (g)	C _{OH} (g)	Volumen Final (mL)	Temperatura (oC)	Morfologías
1	0.0	0.858	0.726	0.552	60	160	Desde nanofibras (barras)- Nanolistones (cintas) Nanocintas-nanoplacas Nanoplacas
2	0.198	0.858	0.726	0.552	60	160	
3	0.792	0.858	0.726	0.552	60	160	
4	1.386	0.858	0.726	0.552	60	160	
5	1.980	0.858	0.726	0.552	60	160	
6	3.6	1.43	1.21	0.8	300	160	

*C_G, C_{Ca}, C_P, C_{OH} representan las cantidades añadidas de ácido glutámico, nitrato de calcio, Fosfato de potasio monobásico, hidróxido de potasio respectivamente.

PROCEDIMIENTO UTILIZADO:

El procedimiento de síntesis por el método hidrotermal asistido por microondas fue desarrollado como sigue:

- ❖ **Para la reacción #1:** Primeramente se disolvió el nitrato de calcio tetrahidratado $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ (Sigma Ultra C4955) en 150 mL de agua desionizada, durante 20 minutos con agitación vigorosa. Por otro lado se preparó una disolución de fosfato de potasio monobásico $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ (Electron Microscopy Sciences 20250) junto con hidróxido de potasio $[\text{KOH}]$ (SIGMA-ALDRICH 221473) en 150 mL de agua desionizada. Después de mezclar rápidamente todos los componentes, la disolución resultante fue transferida con pipeta para llenar 12 vasos de teflón para uso exclusivo en sistema de calentamiento por microondas (tipo “Lined Digestion Vessels”) añadiendo 25 mL a cada vaso, cerrándolos e introduciéndolos inmediatamente en un horno de microondas (CEM MDS-2100, con potencia nominal de 1000 W) por un tiempo de aproximadamente 24 horas.
- ❖ **Para las reacciones #2-#5:** Primeramente se preparó una disolución/suspensión (dependiendo la cantidad de ácido glutámico, determinada en cada reacción de la tabla VII) con ácido glutámico $[\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ (SIGMA G1126) y nitrato de calcio tetrahidratado $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ (Sigma Ultra C4955) en 150 mL de agua desionizada, calentada aproximadamente a 60 °C y vigorosamente agitada durante 2 horas. Por otro lado se preparó una disolución de fosfato de potasio monobásico $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ (Electron Microscopy Sciences 20250) junto con hidróxido de potasio $[\text{KOH}]$ (SIGMA-ALDRICH 221473) en 150 mL de agua desionizada. Después de mezclar rápidamente todos los componentes, la disolución resultante fue transferida con pipeta para llenar 12 vasos de teflón para uso exclusivo en sistema de calentamiento por microondas (tipo “Lined Digestion Vessels”) añadiendo 25 mL a cada vaso, cerrándolos e introduciéndolos inmediatamente en un horno de microondas (CEM MDS-2100, con potencia nominal de 1000 W) por un tiempo de aproximadamente 24 horas.

❖ **Para la reacción #6:** Primeramente se preparó una suspensión con ácido glutámico [$C_5H_9NO_4 \cdot H_2O$] (SIGMA G1126) y nitrato de calcio tetrahidratado [$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$] (Sigma Ultra C4955) en 150 mL de agua desionizada, calentada aproximadamente a 60 °C y vigorosamente agitada durante 2 horas. Por otro lado se preparó una disolución de fosfato de potasio monobásico [KH_2PO_4] (Electron Microscopy Sciences 20250) junto con hidróxido de potasio [KOH] (SIGMA-ALDRICH 221473) en 150 mL de agua desionizada. Después de mezclar rápidamente todos los componentes, la disolución resultante fue transferida con pipeta para llenar 12 vasos de teflón para uso exclusivo en sistema de calentamiento por microondas (tipo “Lined Digestion Vessels”) añadiendo 25 mL a cada vaso, cerrándolos e introduciéndolos inmediatamente en un horno de microondas (CEM MDS-2100, con potencia nominal de 1000 W) por un tiempo de aproximadamente 24 horas.



Figura 9: Vaso de Teflón (junto al carrusel)

La reacción en todos los casos se llevó a cabo a una temperatura de 160 °C y a una presión máxima constante de aproximadamente 690 kPa (100 psi). El precipitado depositado en el fondo de los vasos fue recolectado y lavado varias veces con agua desionizada y etanol absoluto, respectivamente.

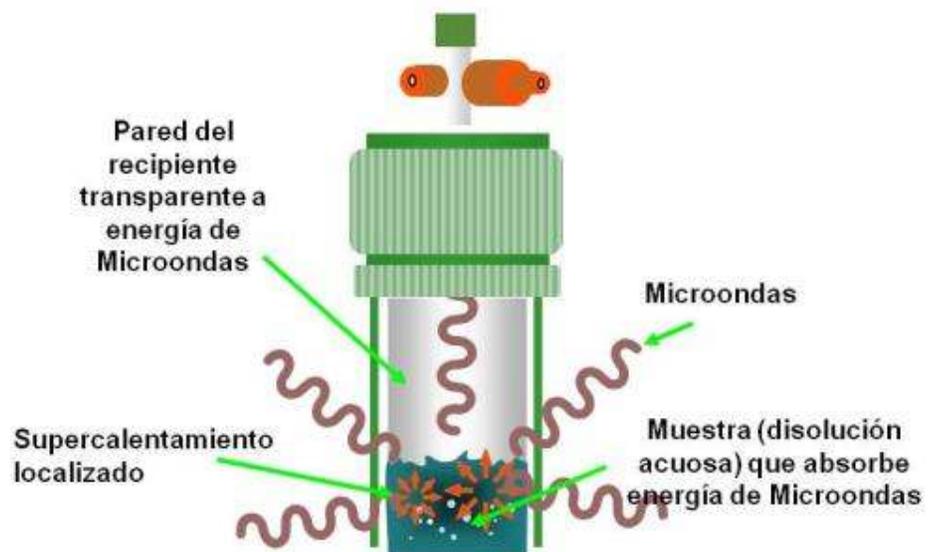


Figura 10: Calentamiento de la Muestra por Microondas



Figura 11: Horno de Microondas

TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN

Espectroscopía infrarroja (FTIR)

Con el fin de asegurar la obtención de hidroxiapatita, los análisis FTIR se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro Bruker vector 33, EE.UU. Las nanoestructuras para las nanoestructuras de placas HAp sintetizadas se separaron de la solución de reacción y se lavaron varias veces con agua destilada, con el fin de eliminar los residuos químicos de la mezcla de reacción y otros posibles componentes formados durante la reacción de síntesis. A continuación, la muestra se secó. Para el análisis de transmitancia, la muestra seca fue molida en polvo fino y se mezcló con bromuro de potasio (KBr) en una relación de volumen de 1:10, respectivamente. Además se realizó un análisis usando la técnica de reflectancia, con una frecuencia de 4 cm^{-1} de resolución. Se colocó una muestra directamente sobre el equipo. Los resultados se pueden ver en la página 53.

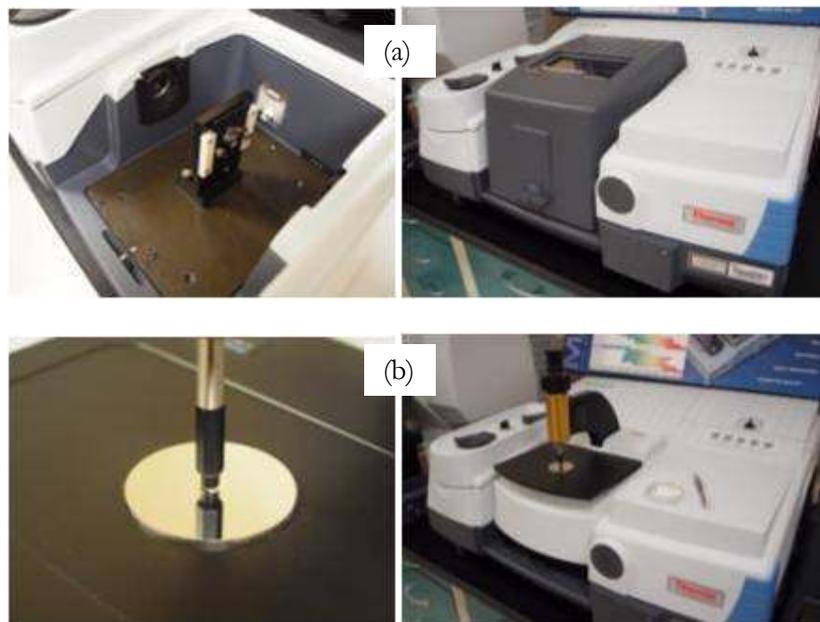


Figura 12: Espectrómetro Infrarrojo (FTIR) Thermo Scientific, modelo Nicolet6700, visto con la configuración en modo Transmitancia (a), Reflectancia (b)

Microscopía Electrónica de Barrido con Electrones (SEM y FE-SEM)

El Microscopio electrónico de barrido (SEM, Scanning Electron Microscope) por sus siglas en inglés, o MEB en español), es aquel que utiliza un haz de electrones en lugar de luz para formar una imagen. Para lograrlo, el equipo cuenta con un dispositivo (filamento) que genera un haz de electrones para “iluminar” la muestra y con diferentes detectores se recogen después los electrones generados de la interacción con la superficie de la misma para crear una imagen que refleja las características superficiales de la misma, pudiendo proporcionar información de las formas, texturas y en forma visual, la diferencia en composición química de sus constituyentes. Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra. También produce imágenes de alta resolución, que significa que características espacialmente cercanas en la muestra pueden ser examinadas a una alta magnificación. La preparación de las muestras es relativamente fácil pues la mayoría de estos microscopios sólo requieren que estas sean conductoras (se requiere recubrir la muestra con una capa fina de grafito u oro) o pueden ser vistas (con baja resolución) en un microscopio con bajo vacío (SEM-LV).

En un microscopio electrónico de barrido tipo SEM (como el de la figura 13), la muestra generalmente es recubierta con una fina capa de carbón o de un metal como el oro, para darle propiedades conductoras a la muestra. Posteriormente es barrida con los electrones acelerados que viajan a través del cañón. Un detector mide la cantidad de electrones enviados que arroja la zona analizada de la muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones, proyectados en una imagen dentro de un monitor de PC o capturadas en una imagen digital. Su resolución está entre 4 y 20 nm, dependiendo de las condiciones de observación del microscopio. A diferencia del microscopio óptico, la luz se sustituye por un haz de electrones, las lentes por electroimanes y las muestras se hacen conductoras recubriendo su superficie con oro o grafito.



Figura 13. Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6390LV

Los nuevos microscopios de barrido FE-SEM trabajan utilizando como fuente de electrones un cañón de emisión de campo, ya sea de tipo cátodo frío “Cold FE” (figura 14a) o de cátodo caliente tipo “Schottky FE” (figura 14b), que proporcionan haces de electrones de alta y baja energía más focalizados, lo que permite mejorar la resolución espacial, minimizar cargas sobre el espécimen a observar, causando además menos daños en muestras sensibles. Gracias a los detectores especiales, es posible obtener imágenes de alta resolución trabajando a bajo vacío y muy bajos kilovoltajes (kV) sin necesidad de metalizar las muestras (no se necesita recubrirlas con oro), lo que permite visualizar muestras biológicas y materiales de muy diverso tipo (polímeros, cerámicas no conductoras, materiales híbridos organo-inorgánicos, etc.), incluso a la escala nanométrica. Es muy importante recalcar la limpieza y almacenar muestras de la microscopia electrónica en la preparación para la proyección de imagen y el análisis de la alta calidad. Por lo general se utiliza un proceso no destructivo de limpieza con luz ultravioleta (UV), para quitar rápidamente los hidrocarburos superficiales de muestras y poder observar adecuadamente en el FE-SEM una imagen de alta resolución y/o superficial usando los electrones secundarios, electrones retrodispersados o explorando los métodos opcionales de la transmisión de electrones por STEM mucho más fáciles, quitando las capas superficiales del hidrocarburo que podrían causar la concentración y las

dificultades del astigmatismo y que obscurecerían el detalle de la superficie y del borde. Las muestras se preparan de esta manera también para obtener mejores resultados para el análisis de EDS y para otras aplicaciones más, donde la contaminación superficial puede suprimir cualquier tipo de información. Los equipos especiales para la limpieza por medio de UV, permite controlar tiempos desde 1 minuto hasta tiempos limpieza de 30 minutos.



Figura 14a. Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo de Cátodo Frío (“Cold FE”) de ultra alta resolución marca Hitachi SU8030. El cañón de electrones tiene un cátodo funcionando a temperatura ambiente.

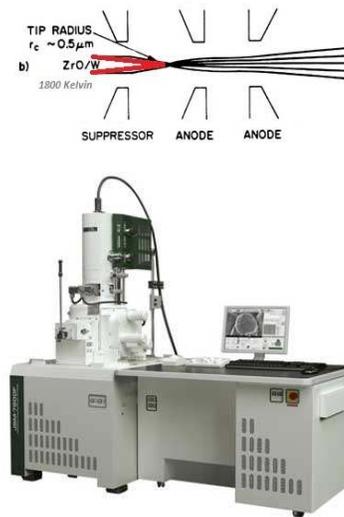


Figura 14b. Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo de Cátodo Caliente (“Schottky FE”) marca JEOL JSM-7800F. El cañón de electrones requiere calentar el cátodo a una temperatura aproximada de 1800 K (> 1,500 °C).

Microscopía Electrónica de Transmisión

Un microscopio electrónico de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés, o MET, en español) es un microscopio que utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto, donde lo característico de este microscopio es el uso de una muestra

sumamente delgada (ultrafina) y que la imagen se obtenga de los electrones que atraviesan la muestra. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces. Para esto, se irradia una muestra delgada con un haz de electrones de densidad de corriente uniforme, cuya energía está dentro del rango de 100 a 200 keV. Parte de esos electrones son transmitidos, otra parte son dispersados y otra parte da lugar a interacciones que producen distintos fenómenos como emisión de luz, electrones secundarios y Auger, rayos X, etc. Todas estas señales se pueden emplear para obtener información sobre la naturaleza de la muestra (morfología, composición, estructura cristalina, estructura electrónica, etc.). El microscopio electrónico de transmisión emplea la transmisión/dispersión de los electrones para formar imágenes, la difracción de los electrones para obtener información acerca de la estructura cristalina (así como la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de la muestra).

Para que se produzca la transmisión de electrones a través de la muestra es necesario que ésta sea delgada, es decir, transparente a los electrones. Es recomendable no utilizar muestras de más de 100 nm de grosor ya que cuanto menor sea el espesor de la muestra mejor calidad de imágenes se puede obtener.

La morfología y microestructura se observaron utilizando un JEOL JEM-2100F usando 120 kV como tensión de aceleración, en campo brillante convencional y las imágenes de alta resolución se registraron. Además, la mayoría de las imágenes se analizaron usando el software Digital Micrograph con el fin de analizar la estructura cristalina de nanoplacas de HAp. Preparación de la muestra era relativamente simple, la muestra se secó y después una pequeña cantidad de material fue puesto en una rejilla de cobre de carbono de película de 3 mm de diámetro.



Figura 15 y 16. Microscopio Electrónico de Transmisión (izquierda) y rejilla de cobre (derecha)



Figura 17 y 18. Observación de nanoplacas (izquierda) y patrón de difracción de electrones (derecha)

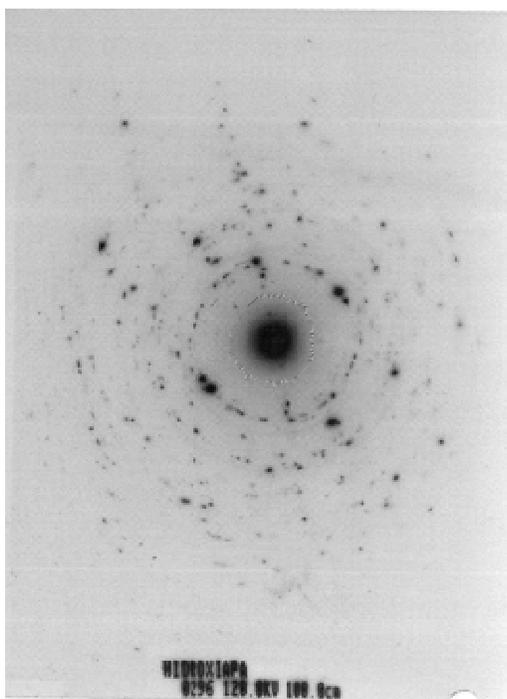


Figura 19. Impresión del patrón de difracción de electrones

Difracción de rayos X de polvos (XRD)

Para corroborar la obtención de una fase de hidroxiapatita adecuada, análisis de XRD se llevaron a cabo a polvos finos de cada una de las nanoestructuras de HAp sintetizados. La muestra se seca y se muele cuidadosamente utilizando un mortero y pistilo. Los patrones de difracción de rayos X de todas las muestras se registraron en un difractómetro (Siemens D5000) que opera a 35 kV y 15 mA, con una radiación $\text{Cu-K}\alpha$. Las mediciones se realizaron a partir de 10° a 90° en una escala de 2θ con un tamaño de paso de $0,05^\circ$.

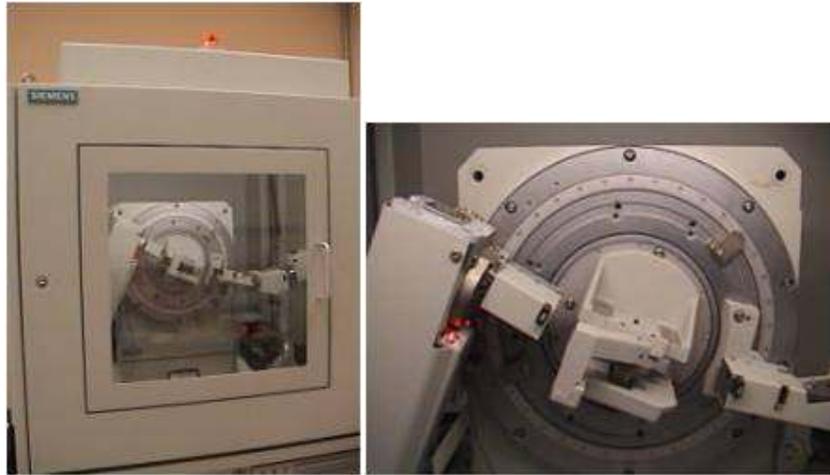


Figura 20 y 21. Difractómetro de Rayos X Siemens (izquierda) y su goniómetro (derecha)



Figura 22 y 23. Salida de Rayos X y portamuestra (izquierda) y difractograma visto en el monitor del equipo (derecha)

Dispersión Dinámica de Luz

La técnica de dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés) se basa en la medición de las fluctuaciones dependientes del tiempo en la intensidad de la luz dispersada por partículas bajo movimiento browniano aleatorio (Kaszuba *et al.*, 2008). En la práctica, la medición de tamaño de partícula de polvos nanométricos requiere la dispersión de estos en un solvente apropiado, lo que normalmente se logra con el uso de surfactantes específicos. Los instrumentos actuales de dispersión dinámica de luz (DLS) pueden determinar la distribución de tamaño de partícula de una muestra en el rango de valores desde 0.1 nm hasta decenas de μm . Los análisis por dispersión dinámica de luz se realizaron en un equipo Zetasizer Nano S Malvern

Instruments Ltda. El equipo utiliza un laser He-Ne de 4 mW, operando a una longitud de onda de 633 nm. Los polvos analizados fueron previamente dispersados en agua en presencia de Triton™ X-114 como surfactante, este con una concentración del 5%.



24a



24 b



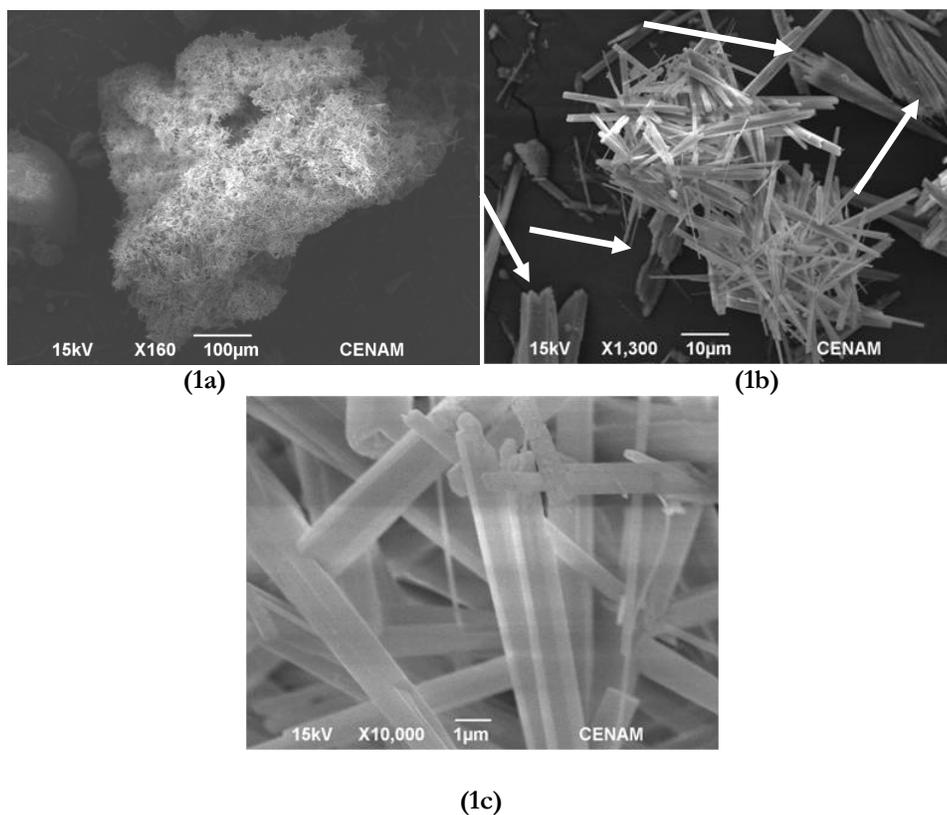
24c

Figura 24. a) Equipo *Zetasizer Nano S* marca Malvern; b) celda (“cubeta”) cuadrada de poliestireno (12 cm x 12 cm x 45 cm) con muestra de HAp en agua con surfactante; c) Compartimento donde se aloja la celda dentro del equipo.

RESULTADOS Y SU DISCUSIÓN

Microscopia de Barrido con Electrones (SEM)

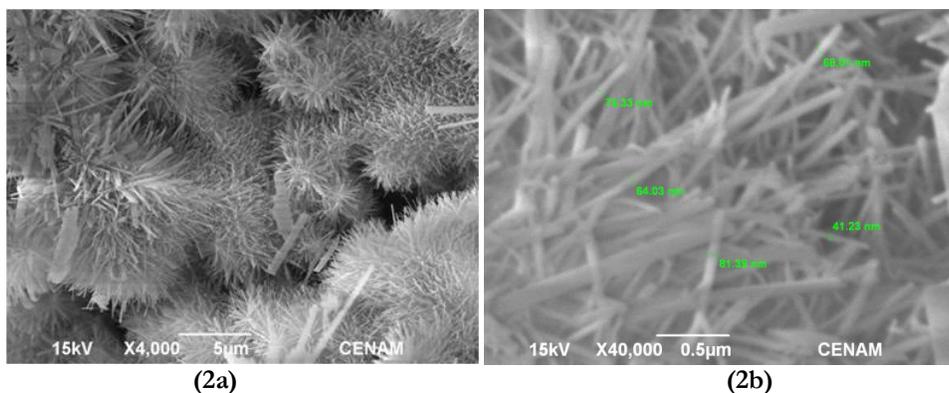
Las micrografías de diferentes nanopartículas obtenidas en la síntesis de hidroxiapatita (HAp) a diferentes concentraciones de Acido Glutámico, se muestran a continuación, las cuales se observaron en un SEM convencional con filamento de tungsteno, recubiertas (metalizadas) a través de una depositación fina de película de oro, con el objetivo de que las nanopartículas de HAp no se “carguen” y distorsionen la imagen.



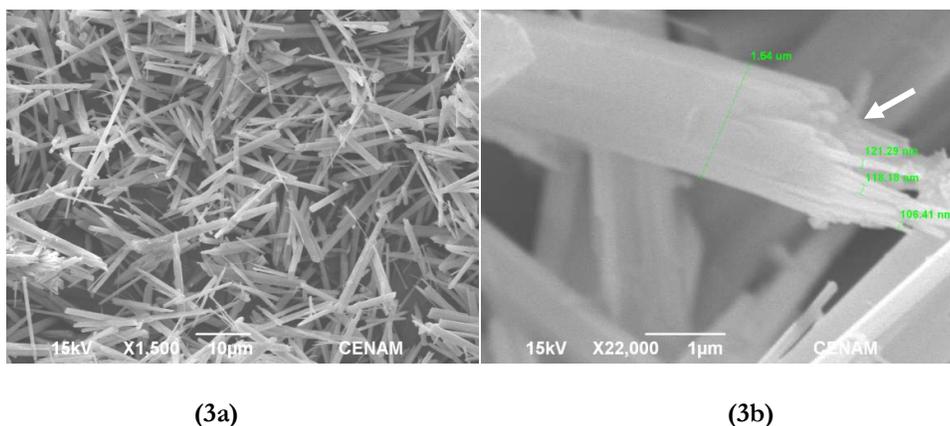
Imágenes 1a, 1b, 1c (X160, X1,300 y X10,000 aumentos respectivamente), capturadas en un SEM con filamento de tungsteno. La muestra corresponde a la mezcla de reacción #01.

La imagen 1a muestra una esfera semiamorfa tal vez deformada durante el proceso de filtrado y secado. La imagen 1b muestra un conjunto de fibras irregulares que conforman la esfera, donde algunas de estas fibras están agrupadas en forma de “brocha” (flecha) y otras

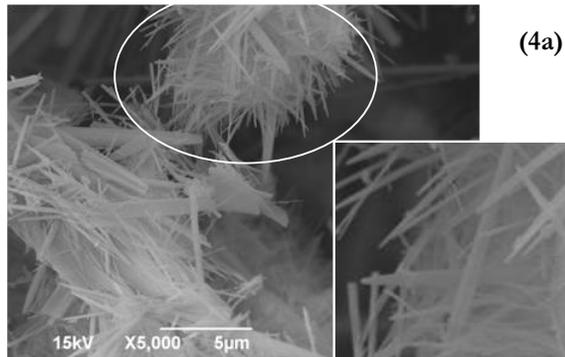
disgregadas. La imagen 1c muestra las fibras amplificadas, en donde los espesores más delgados de cada una de ellas presentaron tamaños entre 120-180 nm. En las tres imágenes se observa una ligera “carga” en la superficie de la muestra, a pesar de haber realizado una deposición fina de película de oro por 3 minutos de duración. $\text{pH} \approx 9-10$.



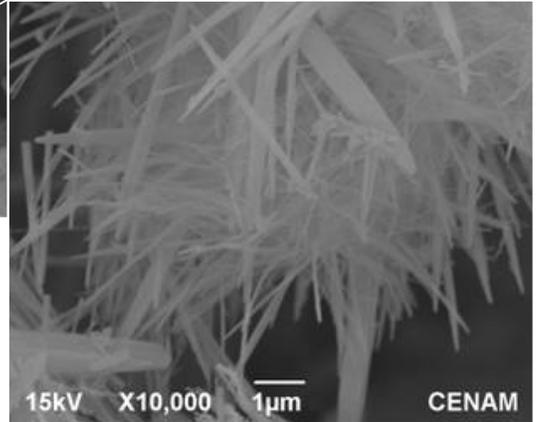
Imágenes 2a y 2b (X4,000 y X40,000 aumentos respectivamente), capturadas en un SEM con filamento de tungsteno. La muestra observada corresponde a la mezcla de reacción #02. La imagen 2a muestra pequeñas esferas de aspecto espinoso formadas en su mayoría con nanofibras redondas y algunas pocas nanocintas. La imagen 2b muestra que el tamaño de las nanofibras redondas es aproximadamente entre 40-90 nm de espesor. $\text{pH} \approx 8$.



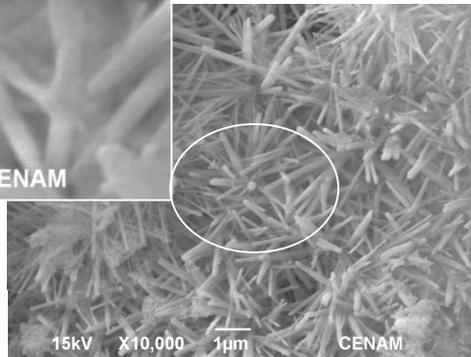
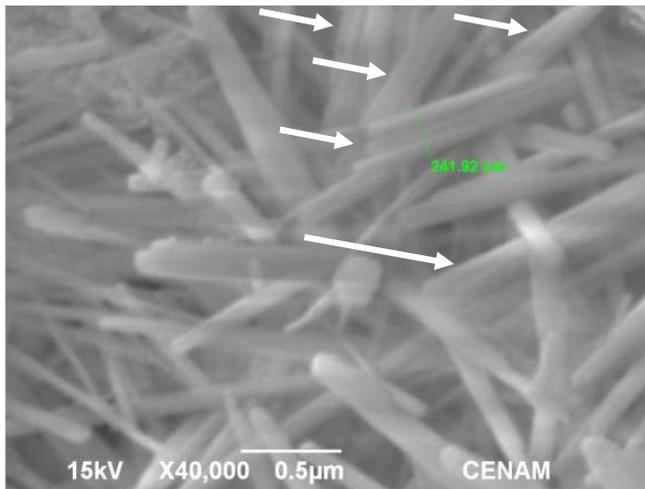
Imágenes 3a y 3b (X1,500 y X22,000 aumentos respectivamente), capturadas en un SEM con filamento de tungsteno. La muestra corresponde a la mezcla de reacción #03. La imagen 3a presenta partículas colapsadas durante el filtrado secado, con tamaños largos mayores a 10 μm en forma de cintas, formadas a su vez por múltiples nanofibras (ver flecha imagen 3b), estas últimas con espesores menores a 100 nm en su mayoría. $\text{pH} \approx 5$.



0 y X10,000 aumentos
 as en un SEM con
 muestra corresponde a
 Las imágenes presentan
 itas, la mayoría con
 chos variados (finas y
 presenta un tamaño

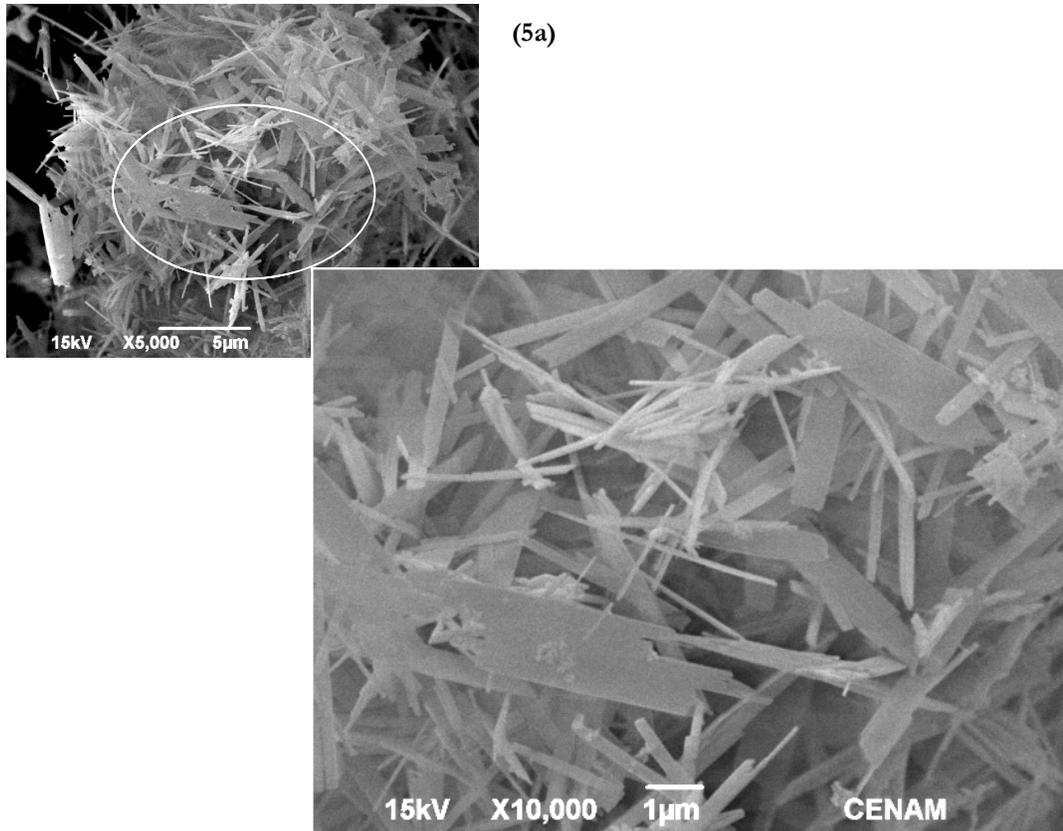


(4b)



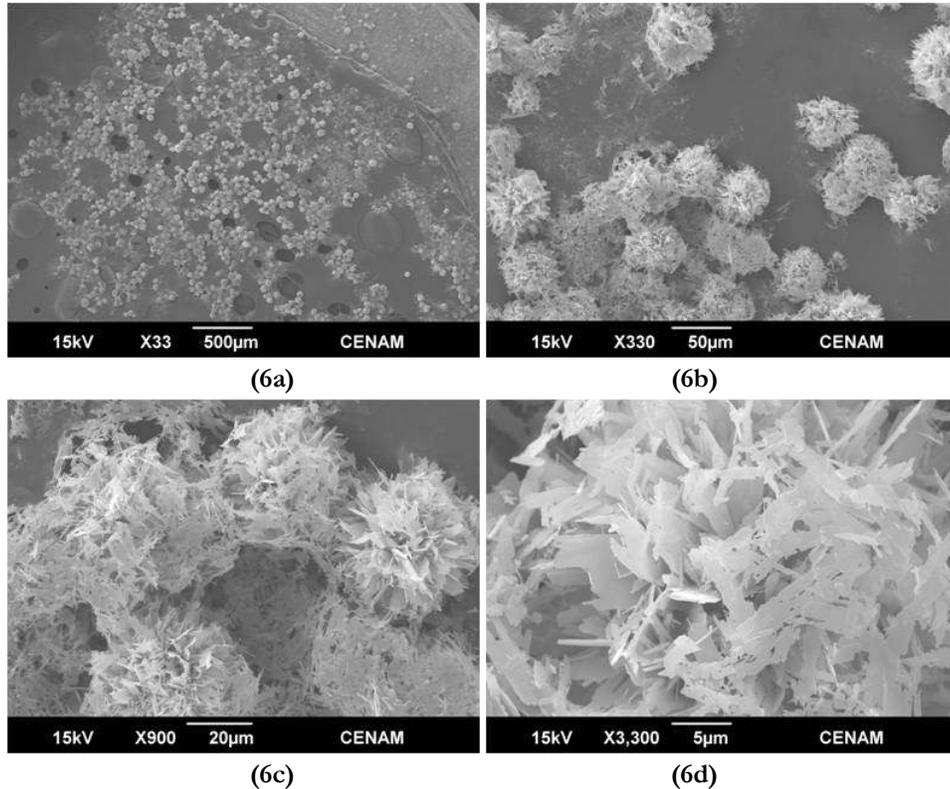
(4d)

Imágenes 4c y 4d (X10,000 y X40,000 aumentos respectivamente), capturadas en un SEM con filamento de tungsteno. La muestra corresponde a la misma mezcla de reacción #04. Las imágenes presentan partículas en forma de fibras sueltas y algunas aglomeradas formando cintas en forma de “brochas” (flechas). La mayoría de las fibras sueltas presentan tamaños menores a 100 nm, pero agrupadas en forma paralela (parecidas a brochas) tienen tamaños mayores a 200 nm, ya que forman fajos con 4 o más fibras. pH≈4-5.



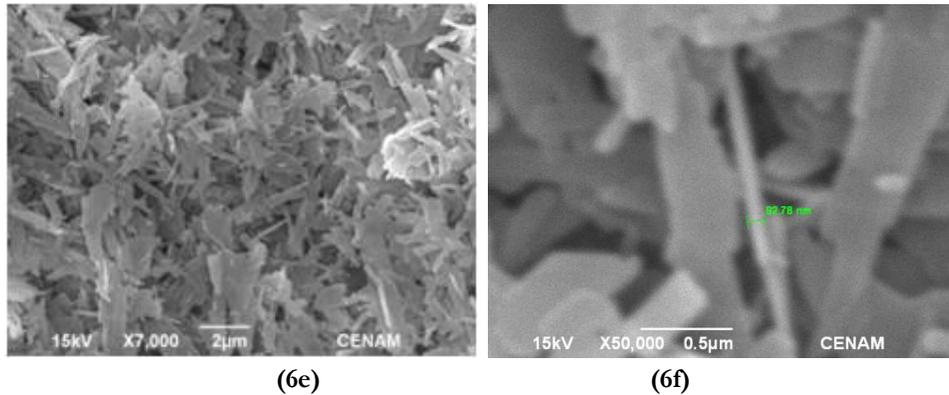
Imágenes 5a y 5b (X5,000 y X10,000 aumentos respectivamente), capturadas en un SEM con filamento de tungsteno. La muestra corresponde a la mezcla de reacción #05. Las imágenes presentan partículas en forma de nanocintas sueltas y algunas aglomeradas formando nanoplacas. Las fibras sueltas y las nanoplacas presentan tamaños en sus espesores menores a 100 nm. pH≈4.

Las imágenes 6a, 6b, 6c, 6d muestran pequeñas esferas (de apariencia espinosa) compuestas con nanoplacas de hidroxiapatita obtenidas por medio de la síntesis por el método hidrotermal asistido por microondas (24 h), donde una pequeña gota de líquido se colocó sobre cinta adhesiva de grafito (antes del enjuague y filtración), permitiendo dejar evaporar el líquido antes de introducir la muestra al SEM.



Imágenes 6a, 6b, 6c y 6d: Esferas pequeñas conformadas de nanoplacs de HAp observadas por SEM a 15 kV a varias ampliaciones. Los parámetros de preparación de la reacción #6 fueron los siguientes: G=3.6 g, Ca =1.43 g, P = 1.21 g, OH = 0.8 g, volumen de líquido = 300 mL, T= 160 °C, en 3 etapas: 7 - 13 -3 horas continuas, con pausas de 11 horas entre cada una de las 3 etapas.

Las imágenes 6c y 6d muestran las nanoplacs colapsadas de los cúmulos esféricos obtenidos (de las imágenes 6a-6d) resultado de la filtración por vacío de la hidroxiapatita, después de 24 horas de reacción, con una relación Ca/P = 1.67 aproximadamente. Las nanoplacs presentan espesores menores a 100 nm y dimensiones variables a escala micrométrica a lo largo y ancho de las mismas (aproximadamente 1-5 µm de largo y 1-3 µm de ancho o menor).



Imágenes 6e y 6f: Nanoplacas observadas por SEM a 15 kV a X7000 y X50,000 ampliificaciones (respectivamente), donde se aprecia una morfología tipo “corteza de árbol”. En la imagen 6f se puede observar la vista lateral de una nanoplaca con aproximadamente 93 nm de espesor. Las muestras se recubrieron con una delgada capa de oro.

Microscopia de Barrido con Electrones de Emisión de Campo (FE-SEM)

De las imágenes 7a y 7b se observan las nanoplacas de hidroxiapatita vistas en el Cold FE-SEM, a varios voltajes de aceleración sin necesidad de recubrimiento conductor. Estas imágenes tienen mejor resolución gracias a los diferentes sistemas de detección de señal y características propias del microscopio. En cada imagen se indican las condiciones de observación en la “barra de datos de la imagen” (figura 25). Esta barra de datos del microscopio de Hitachi puede ser configurada por el usuario para mostrar la variedad de condiciones del instrumento (voltaje de aceleración, distancia de trabajo, tipo de detector) y los parámetros de la imagen (amplificación, escala de referencia). Abajo esta la explicación de los más comunes utilizados:

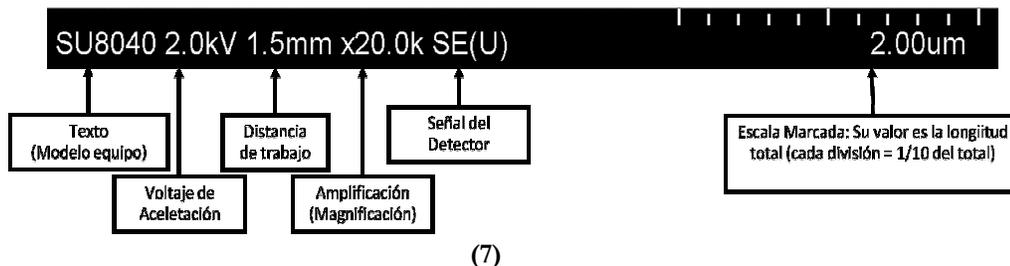
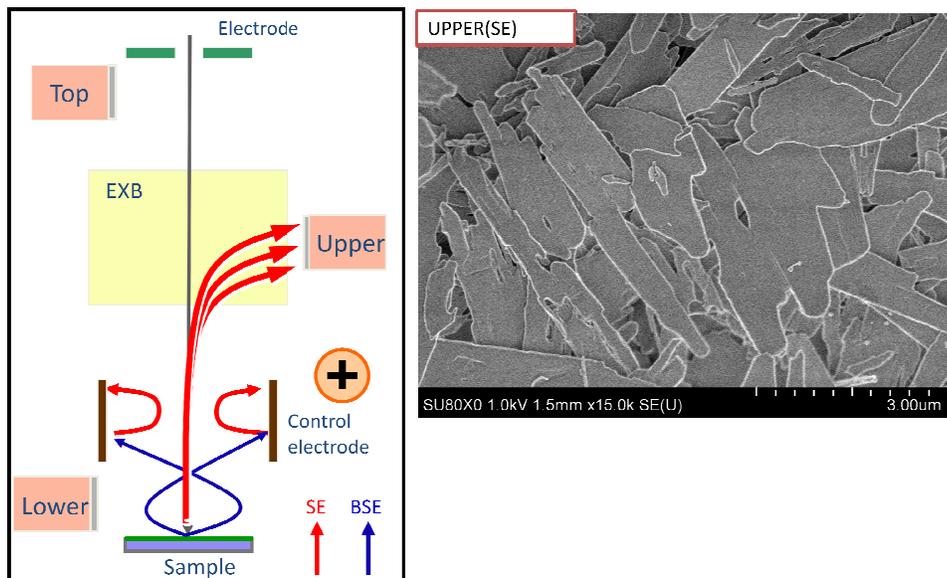
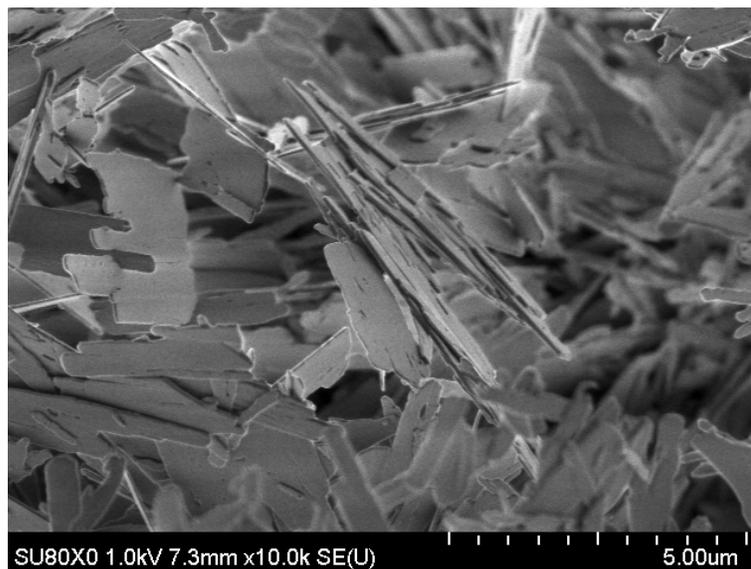


Figura 25: Barra de datos comúnmente desplegada en cada imagen capturada.



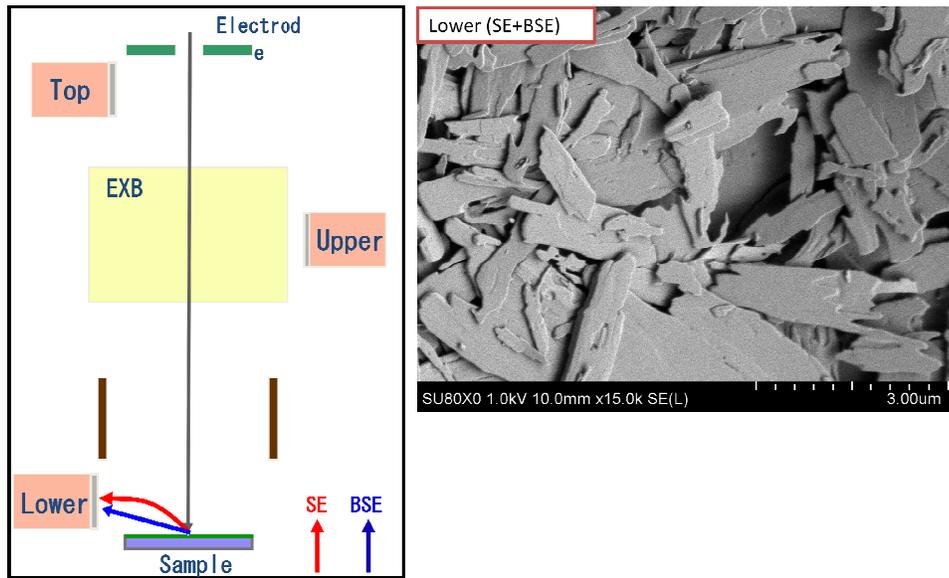
(7a)

Imagen 7a: Nanoplasas de hidroxapatita observadas por Cold FE-SEM (derecha) a una amplificación de X15,000, a 1 kV, utilizando el detector “Upper”. El modo de detección de electrones secundarios (SE), indicado con flechas rojas (izquierda), se encarga de resaltar la información de la superficie superior de las nanoplasas, para confirmar la topografía general de la superficie de la muestra. En la imagen de abajo (7a-bis) se observan algunas nanoplasas vistas de canto.



(7a-bis)

Imagen 7a-bis: En la imagen se observan algunas nanoplasas vistas de canto (X10,000).



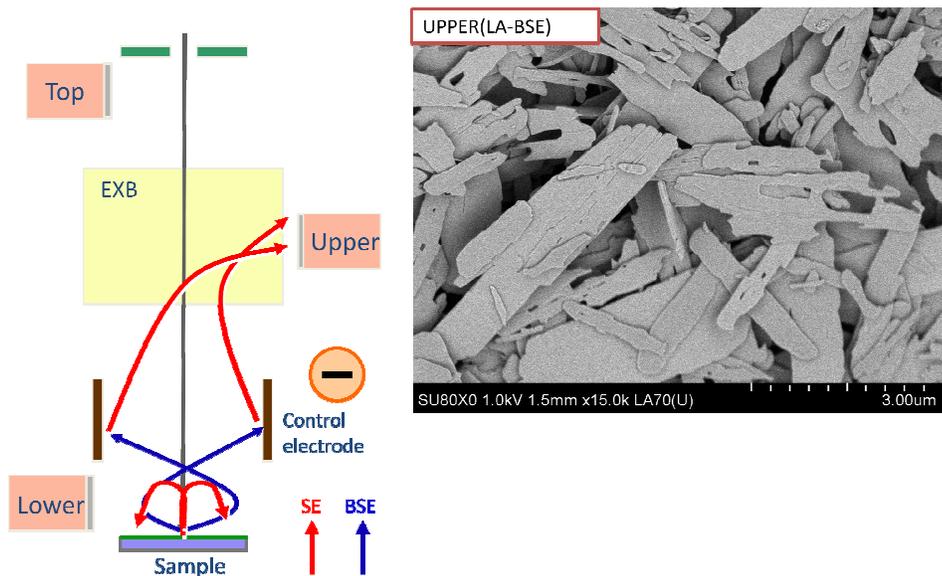
(7b)

Imagen 7b: Nanoplacas de hidroxiapatita observadas por Cold FE-SEM (derecha) a una amplificación de X10,000, a 1 kV, utilizando el detector “Lower”. El modo de detección de electrones secundarios (SE) más electrones electrodispersados (BSE), indicado con flechas rojas y azules respectivamente (izquierda), se encarga de mejorar la información topografía general de la superficie de la muestra. En la figura 7b-bis se observan subcapas sobre la superficie de las nanoplacas, las cuales no se podían ver en la figura 7a.



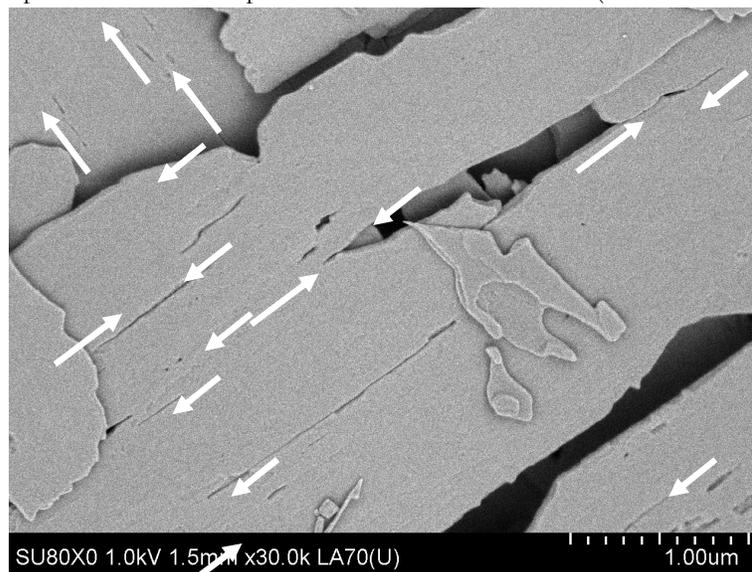
(7b-bis)

Imagen 7b-bis: Se observan subcapas sobre la superficie de las nanoplacas, las cuales no se podían ver en la figura 7a.



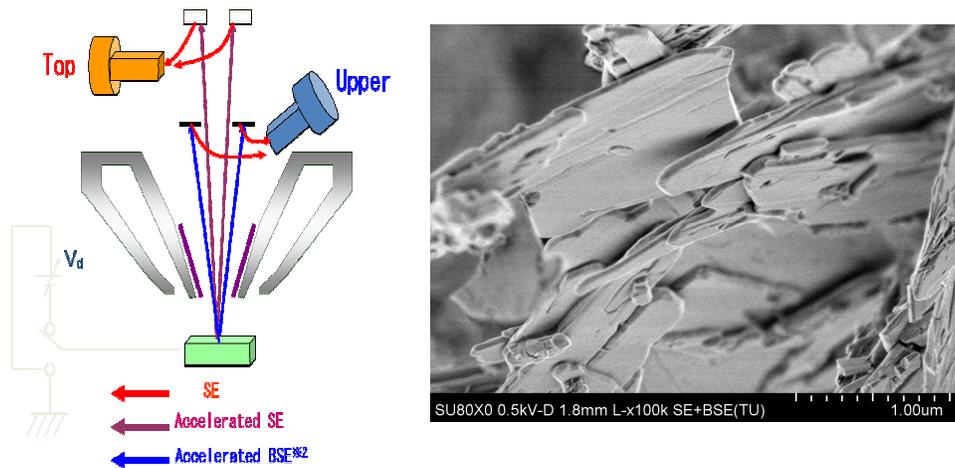
(7c)

Imagen 7c: Nanoplacas de hidroxiapatita observadas por Cold FE-SEM (derecha) a una amplificación de X15,000, a 1 kV, utilizando el detector “Upper”. El Sistema ExB legendario de Hitachi permite filtrar Electrones secundarios de baja energía, como se muestra en la imagen de la izquierda, que representan la información de la retrodispersión de bajo ángulo (LA-BSE) mezclado con algo de señal de electrones secundarios (SE) para identificar la estructura de la superficie de hidroxiapatita. En la figura 7c-bis (la cual se observa a X30,000) que la nanoplacas están formada por nanocintas unidas a lo ancho (flechas blancas).



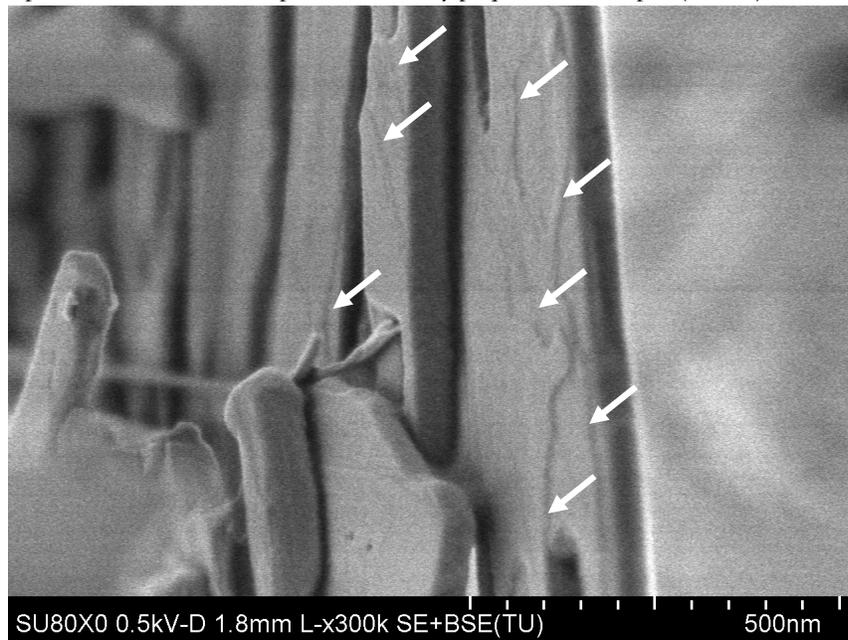
(7c-bis)

Imagen 7c-bis (la cual se observa a X30,000) muestra que las nanoplacas están formada por nanocintas unidas a lo ancho (flechas blancas).



(7d)

Imagen 7d: Nanoplacas de hidroxiapatita observadas por Cold FE-SEM (derecha) a una amplificación de X100,000, a 0.5 kV, utilizando el detector “Top+Upper”. El Sistema tiene la capacidad de separar la señal de baja energía y alta energía. La señal de baja energía es detectada por el detector superior (“Top”). Señal de baja energía es beneficiosa para resaltar el contraste de voltaje, pero es muy susceptible a que se la muestra se “cargue”. La señal de alta energía es detectada por el detector superior (“Upper”). La señal de alta energía es beneficiosa para obtener la imagen topográfica con rica información. La señal de alta energía puede mantenerse suministrando información muy estable, incluso en la observación de esta muestra no conductora. En la figura 7d-bis (la cual se observa a X300,000) muestra que la nanoplacas están construidas por numerosas y pequeñas nanocapas (flechas).



(7d-bis)

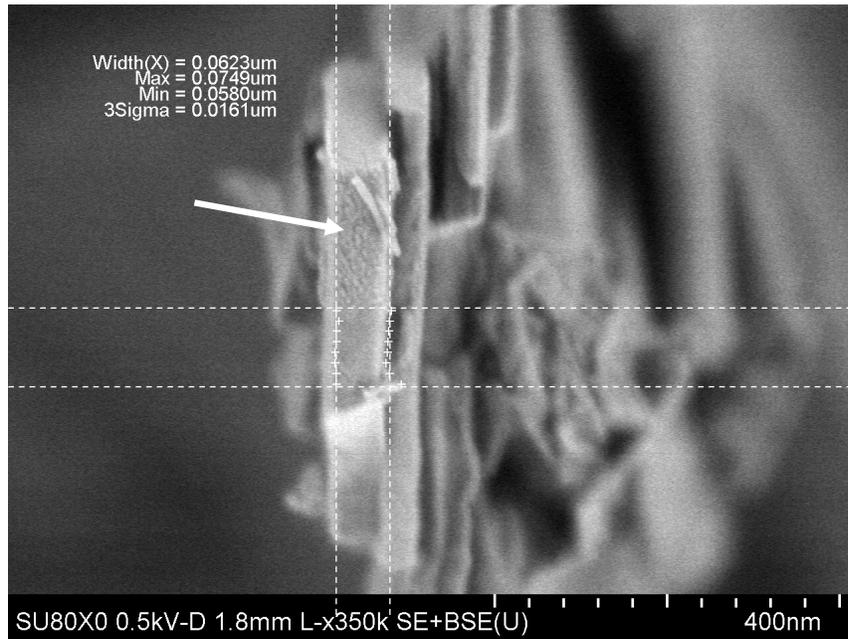


Imagen 7e: Nanoplacas de hidroxiapatita observadas en corte lateral por Cold FE-SEM a una amplificación de X350,000, a 0.5 kV, utilizando el detector “Upper”. Se pueden observar en la zona de medición (flecha) pequeñas nanofibras que conforman la nanoplaca. El tamaño promedio medido del espesor de la nanoplaca es de aproximadamente 62.3 nm.

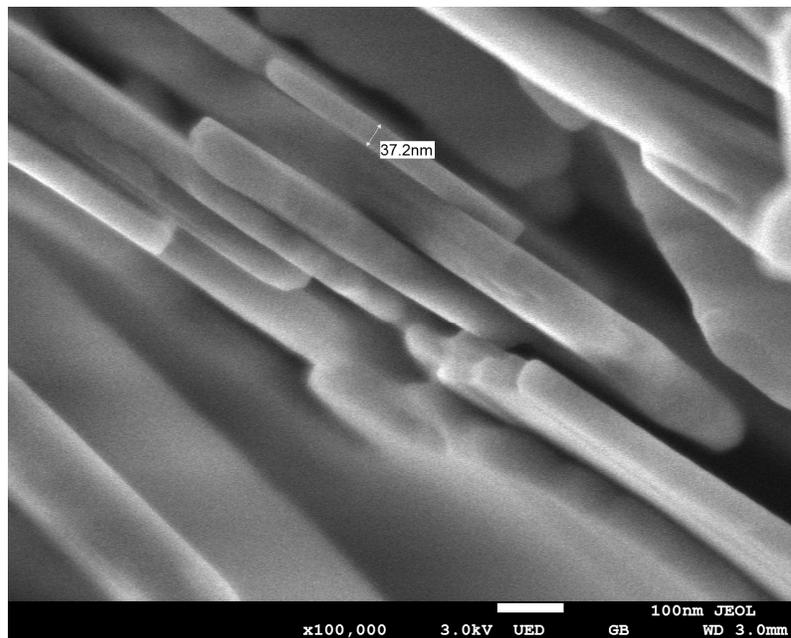


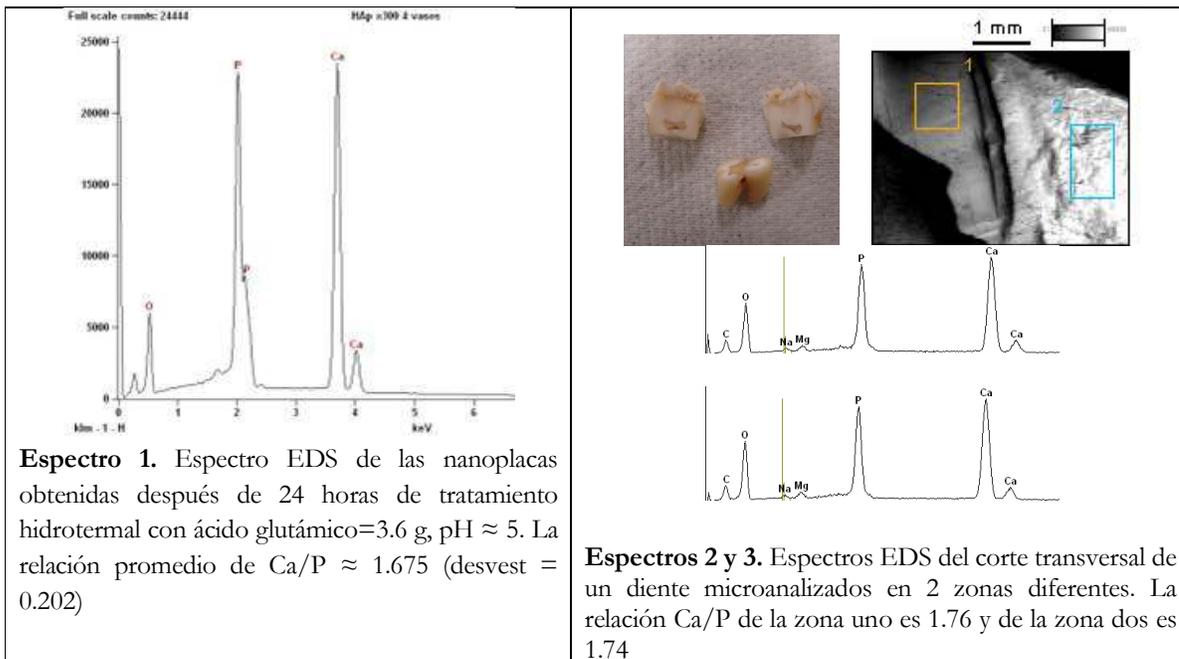
Imagen 7f: Nanoplacas de hidroxiapatita observadas en corte lateral por Schottky FE-SEM de JEOL, a una amplificación de X100,000 a 3.0 kV. El tamaño del espesor de las nanoplacas que están perpendiculares al plano de medición varía entre 40 nm y 80 nm aproximadamente.

Microanálisis por Espectroscopía de Energía Dispersiva de Rayos X (*Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*, “EDS”)

La relación Ca/P es importante en las estructuras de HAp dado que, como se ha mencionado en la tabla VI, en las HAp comerciales pueden existir gran cantidad de impurezas que modifiquen el comportamiento, hay que tener en cuenta que esta relación tiene un valor orientativo. Así tenemos que, mientras menor sea la relación Ca/P, mayor es la acidez y solubilidad de la muestra. Para relaciones Ca/P < 1, tanto acidez como solubilidad presentan valores muy elevados. Por otro lado, estos parámetros disminuyen bastante para relaciones Ca/P próximos al valor de 1.67, el cual corresponde al valor de la hidroxiapatita estequiométrica, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Varios análisis EDS se llevaron a cabo a las muestras obtenidas utilizando cada uno de los diferentes tipos de mezclas de reacción mencionadas anteriormente. Cada muestra se analizó en diez sitios diferentes y los resultados del porcentaje atómico se utilizaron para determinar la composición elemental medio de la muestra. Aunque las superficies de las muestras no eran completamente lisas, los resultados fueron similares en la mayoría de los sitios analizados. Utilizando los resultados de EDS de cada tipo de muestra, la media de la relación Ca/P se calculó. A pesar de la composición química similar (exceptuado en el contenido de ácido glutámico), el valor de la relación Ca/P varía para los diferentes tipos de muestras. La tabla VIII muestra el promedio de la relación Ca/P determinado para cada tipo de mezcla de reacción utilizada en esta investigación. Además, el espectro 1 muestra un ejemplo de EDS que se obtuvo de los microanálisis en las nanoplacas y en el espectro 2 y 3 se muestra un microanálisis en un diente humano. En el espectro, las señales correspondientes a Ca y P fue etiquetado, las otras señales en el lado izquierdo corresponde al oxígeno.

Tabla VIII. Relación Ca/P promedio (calculada)

Mezcla de reacción #	Relación Ca/P promedio
1	1,71
2	1,73
3	1,66
4	1,65
5	1.67
6 (nanoplacas)	1.675



Observación de nanoplacas usando electrones transmitidos por STEM.

A través de un accesorio STEM del microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (con cátodo frío) Hitachi, fue posible la observación de las delgadas nanoplacas de HAp, al formar una imagen de los electrones transmitidos a través del sistema de detección de Campo Brillante (BF)-STEM (absorción de electrón) y Campo Oscuro (DF)-STEM (contraste de número atómico). En las imágenes a continuación se observan nanoplacas por STEM.

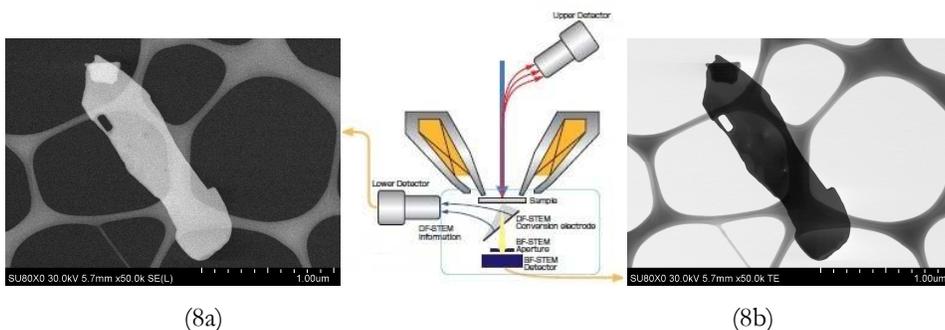


Imagen 8a y 8b (ambas a X50,000), vistas en Campo Oscuro (DF)-STEM (izquierda) y por Campo Brillante (BF)-STEM (derecha). La muestra es una nanoplaca montada sobre una malla para facilitar el paso de los electrones a través de ella (a 30 kV). La ventaja del STEM a comparación con el convencional TEM, es que las muestras de HAp no se degradaron demasiado.

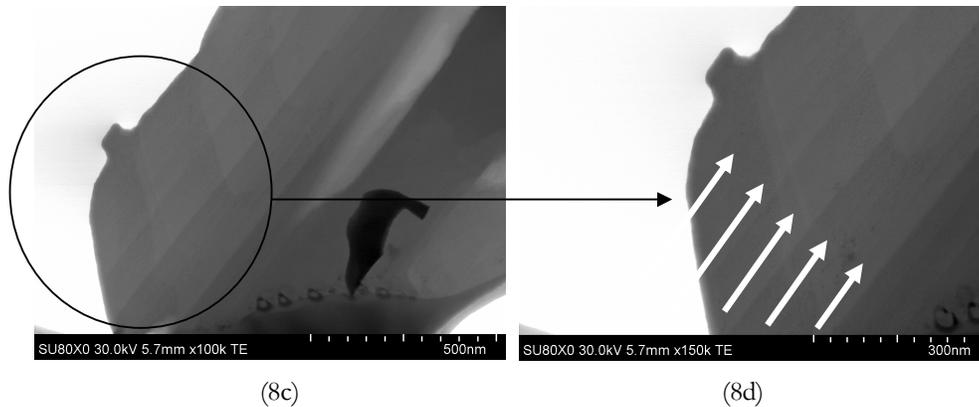


Imagen 8c y 8d (a X100,000 y X150,000 respectivamente), vistas en Campo Brillante (BF)-STEM. En esta nanoplaca se observa que está compuesta de varias nanocintas alineadas a lo largo (flechas).

De la observación de las morfologías obtenidas de las reacciones #1 a la #6 (al cambiar en cada una de ellas los contenidos de ácido glutámico) incluyen lo siguiente:

- Requieren un control muy preciso sobre las condiciones de reacción, ya que las síntesis antes mencionadas tienen poco o ningún control sobre características de las partículas de HAp (es decir, tamaño de partícula, área de aglomeración superficial, forma, homogeneidad dentro de cada reacción, etc.).

En forma general, ayuda de la siguiente ilustración, se puede resumir el resultado de las reacciones con respecto a las morfologías obtenidas, variando la cantidad de ácido glutámico y su pH obtenido:

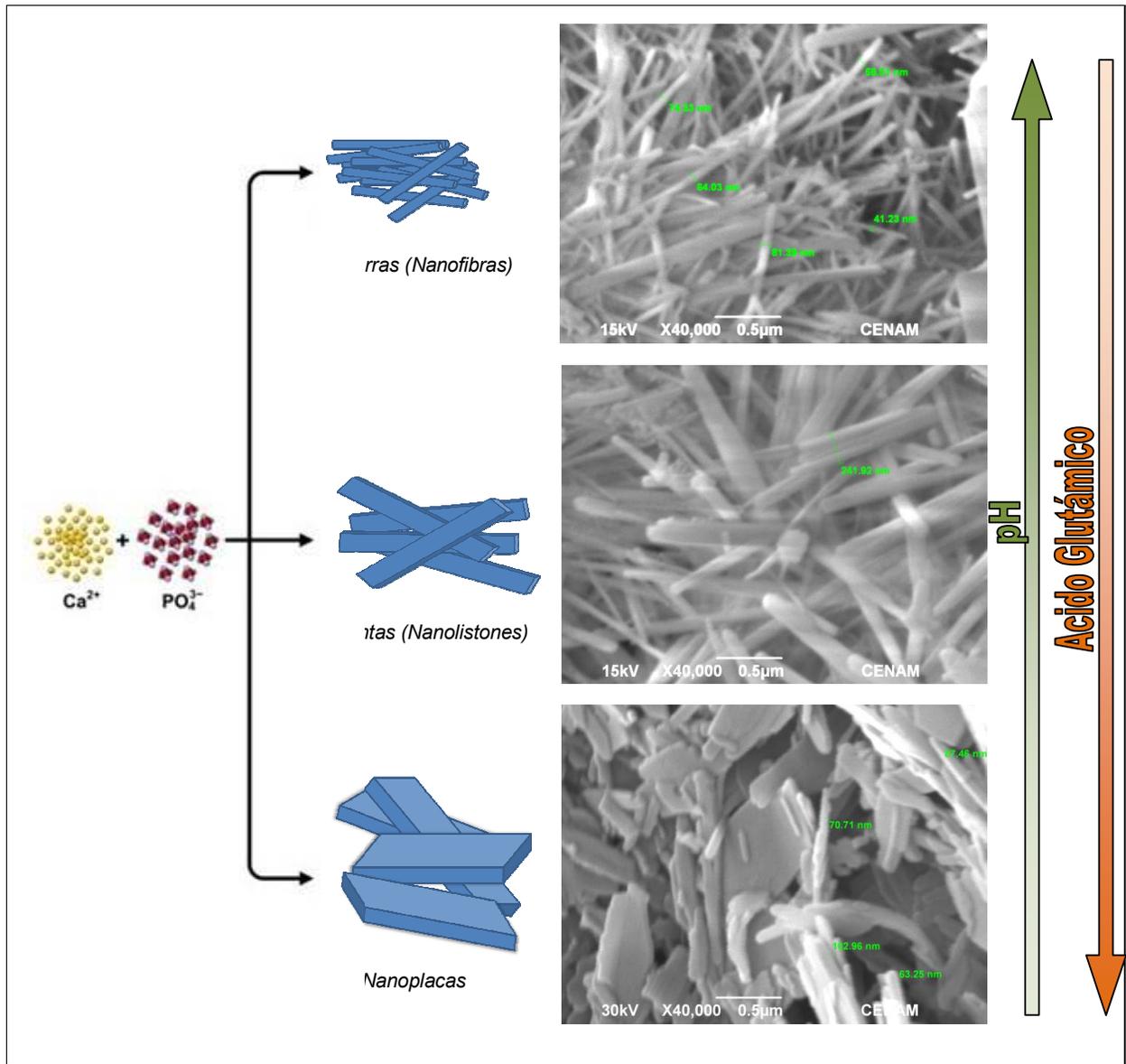


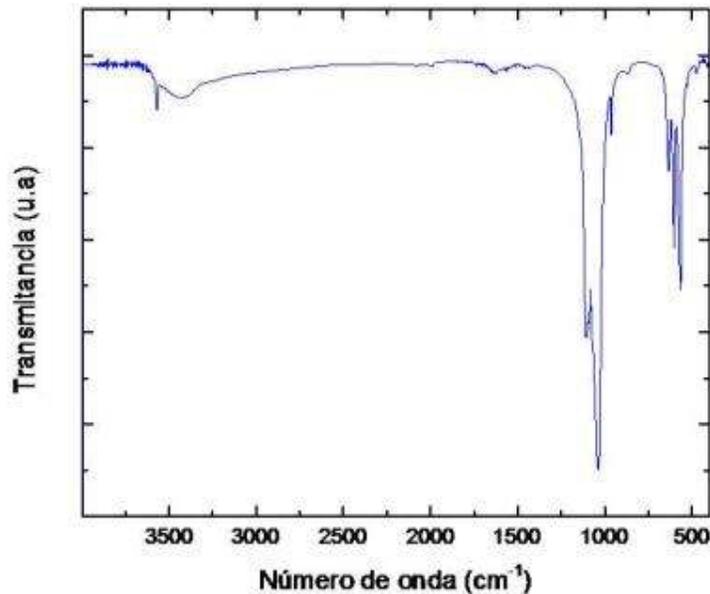
Figura 26: Morfologías obtenidas al variar el contenido de ácido glutámico (C_6) y relacionado con su pH obtenido.

Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Los análisis por la técnica de espectroscopia infrarroja (FT-IR) de las muestras muestran que la hidroxiapatita se obtuvo exitosamente. Cada una de las muestras analizadas genero un espectro similar al mostrado en el espectro 4. Las principal contribuciones de grupos (PO_4^{3-}) y (OH) para el espectro IR fueron identificadas. La banda a 962 cm^{-1} estaba relacionada con la vibración de estiramiento de iones PO_4^{3-} , y las bandas a **1101/1081**, **1034/1021**, **635/629**, **605/599**, **565/559**, **471/472** cm^{-1} se asociaron a la vibración de deformación de iones fosfato por **transmitancia**/reflectancia respectivamente. Unas señales intensas fue registradas en 3568 y 630 cm^{-1} que corresponden a la vibración de los grupos OH. Todas las señales registradas eran estrechas y también tienen altas intensidades. El espectro 4 mostrado a continuación fue similar a los descritos en trabajos anteriores, que confirma la obtención de HAp [11].

Tabla IX. Resultados del análisis por FT-IR en modo de transmitancia y Reflectancia

Asignación	Frecuencia Vibracional Observada (cm^{-1})	
	Transmitancia	Reflectancia
PO_4^{3-} deformación ν_2	471	472
PO_4^{3-} deformación ν_4	565	559
PO_4^{3-} deformación ν_4	602	599
OH estructural	630	630
PO_4^{3-} estiramiento ν_1	962	961
PO_4^{3-} deformación ν_3	1034	1021
PO_4^{3-} deformación ν_3	1101	1081
OH estructural	3568	3568



Espectro 4. Espectro FT-IR obtenido por transmitancia. Este muestra la identificación de bandas características correspondientes a HAp

Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM)

Diferentes superficies de nanocintas y nanoplacas fueron observadas por HRTEM. Arreglos de líneas y puntos fueron registrados en las imágenes, las cuales corresponden a la estructura cristalina de la HAp. Usando el software Digital Micrograph® diseñado por Gatan, fue posible determinar las distancias de separación entre las líneas de la imagen, que son las distancias interplanares en la estructura de HAp. Para las **nanoplacas**, esas líneas en la orientación horizontal tienen una separación de 0.525 nm la una de la otra, y esta distancia está relacionada a los planos (101). Las líneas en la dirección vertical tienen un espaciamiento interplanar de 0.472 nm y corresponden a los planos (110).

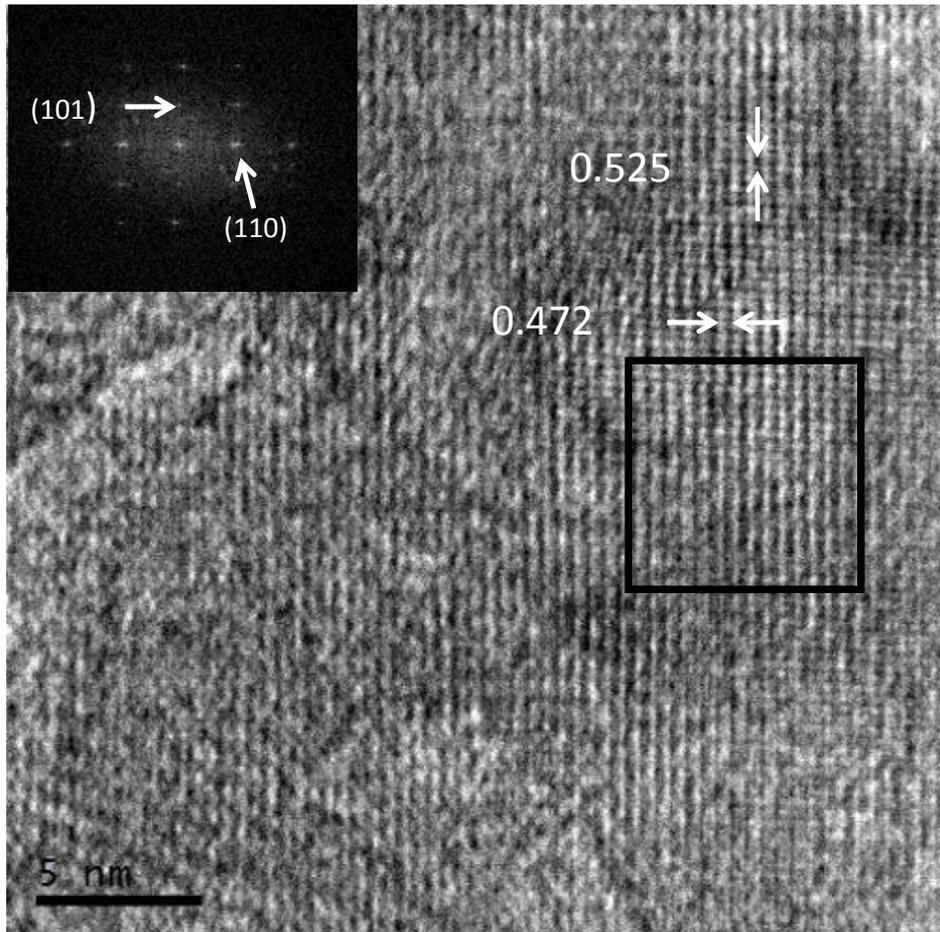


Imagen 9: Imagen de HRTEM de la superficie de una nanoplaca. El arreglo de puntos y líneas es consecuencia de la estructura cristalina de HAp. Un par de distancias interplanares fueron determinadas. El recuadro negro dentro de la imagen HRTEM muestra una FFT obtenida del área marcada.

Fue difícil de obtener patrones de difracción de las nanoestructuras debido a la alta energía del haz de electrones, la cual podría producir degradación en la muestra casi inmediatamente. El recuadro negro dentro de la imagen 9 es la transformada rápida de Fourier (FFT) del área de la muestra que está dentro del recuadro. De esta FFT se produjo un arreglo de puntos el cual tiene una simetría 2 alrededor del eje de Zona. Los planos cristalinos que contribuyeron a formar la FFT fueron los (110) y los (101). La intensidad observada dentro de los puntos relacionados con los planos (110) es más alta que la asociada al plano (101). Lo último es evidencia de que los planos (110) son más abundantes dentro de la estructura cristalina. Cuando otras nanoplacas fueron observadas, se obtuvieron resultados interesantes. La imagen 10 muestra una imagen de alta resolución de una superficie de otra nanoplaca. Esta imagen fue muy similar a otras obtenidas de otras muestras de HAp. Todas las

imágenes tienen en común el arreglo lineal con separaciones aproximadas de 0.343 nm correspondiente a los planos (002), y 0.35 nm relacionados a los planos (201). Además, las FFT producidas de la mayoría de las imágenes tienen arreglos similares de puntos tales como están mostrados en el recuadro de la imagen 10. El patrón de puntos en la imagen tiene una simetría 2. La alta intensidad observada corresponde a los planos (002) y por lo tanto, es posible suponer que esos planos cristalinos son más abundantes dentro de la estructura cristalina de HAp en las nanoplacas.

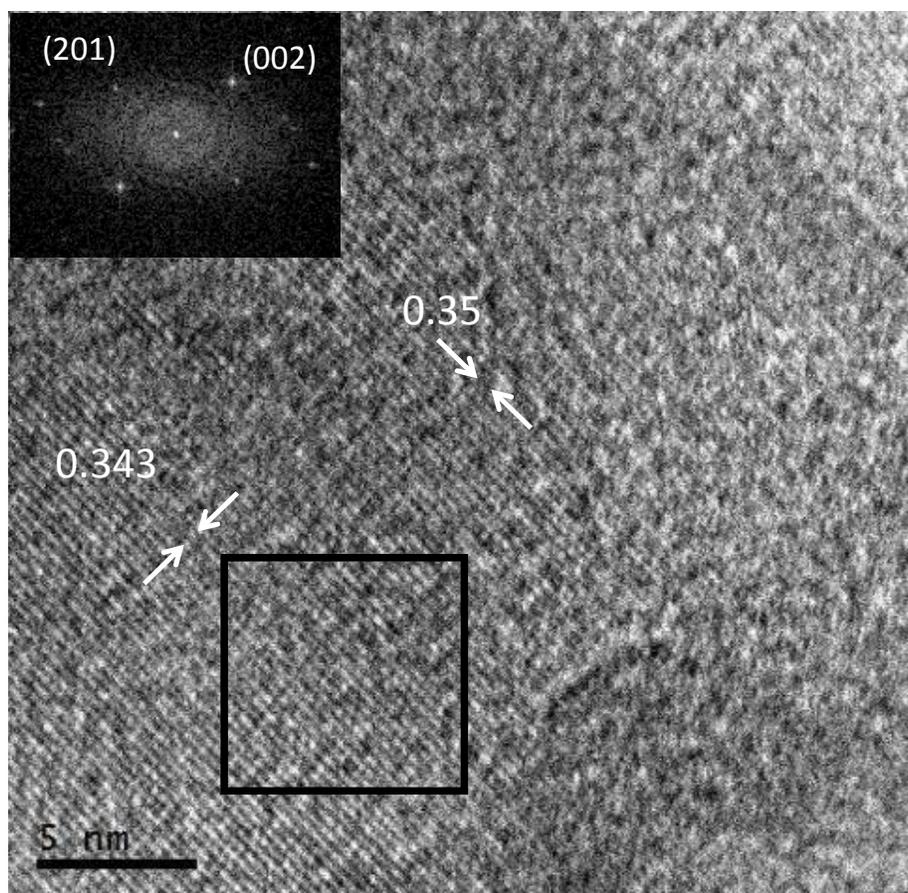


Imagen 10. Imagen de HRTEM de la superficie de otra nanoplaca. En esta imagen, se determino la distancia interplanar relacionada con los planos (201) y (002). El recuadro negro dentro de la imagen HRTEM muestra una FFT obtenida del área dentro del cuadrado marcado. Los puntos fueron asociados a sus planos correspondientes.

Con respecto a las **nanocintas**, varias imágenes fueron tomadas de diferentes superficies de las mismas, como las mostradas en la imagen 3b, en donde se aplicó un proceso similar como el arriba descrito, utilizando el programa diseñado por Gatan. Los resultados obtenidos fueron similares a los encontrados en las nanoplacas. La imagen 11 muestra una imagen HRTEM de la superficie de una nanocinta. Claramente se observa un arreglo de puntos en esta figura, donde fueron determinadas las distancias de 0.407 nm y 0.308 nm. La FFT mostró un patrón de puntos correspondientes a los planos (200) y (210). Al aplicar la transformada inversa al patrón en 11b se generó la imagen mostrada en la figura 11c, en esta imagen se eliminó la contribución de los planos mencionados anteriormente y por ello ya no son tan visibles las líneas claras y oscuras que están presentes en la imagen 11a. La abundancia de los planos (200) es claramente verificada y consecuentemente, si en la superficie de la nanocinta abundan los planos (200) y los (210) es posible afirmar que a lo largo del espesor se tiene que la estructura cristalina tiene una orientación preferencial en la dirección [001].

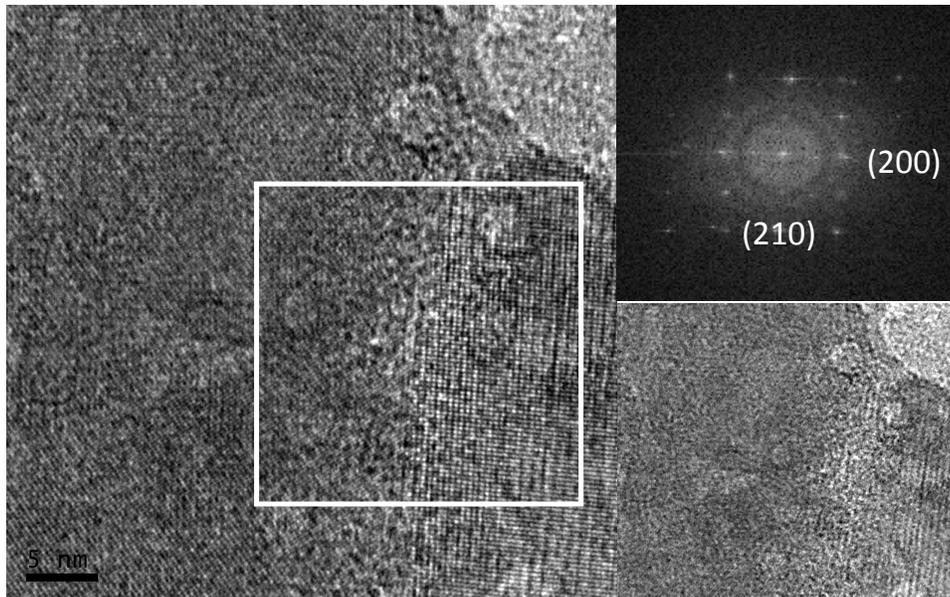


Imagen 11: a) Imagen de HRTEM de la superficie de una nanocinta, b) FFT de la zona encerrada por el recuadro blanco, y c) imagen formada a través de la inversa de FFT de (b) donde la señal del plano (200) fue enmascarado. Note la eliminación de puntos en (c), estos son claramente observados dentro del cuadro en (a).

En el caso de **nanofibras**, se pudieron llevar a cabo observaciones a bajas ampliaciones en transmisión convencional de las muestras, pero la obtención imágenes a alta resolución fueron un poco más difíciles de obtener debido al rápido deterioro de los nanocristales de HAp producido por la energía del haz de electrones. Por la misma razón no se pudieron obtener patrones de difracción de electrones. La imagen 12 muestra una imagen convencional de una nanofibra en campo claro y es posible observar una sola fibra en detalle. El espesor de esta nanofibra fue uniforme y fue muy corto en comparación con su longitud. La homogeneidad en el espesor, fue un atributo en común en la mayoría de las nanofibras observadas. Las condiciones de operación del microscopio permitieron generar una micrografía en HRTEM de un extremo de una nanofibra, la cual también es mostrada en esta figura. En la imagen es posible observar un arreglo periódico de líneas de puntos. Las distancias entre las líneas fueron determinadas y tuvieron una distancia de 0.471 nm relacionadas con los planos (110) y 0.81 nm que correspondieron a los planos (100). Cuando se generó una FFT de la imagen de HRTEM, un arreglo de puntos se obtuvo y también se muestra dentro de la misma imagen 12 (recuadro negro). El patrón de puntos fue formado por las contribuciones de los planos (100) y (110). Los puntos de mayor intensidad observados corresponden a las contribuciones de los planos (110) y esto es una evidencia de la abundancia de este tipo de planos. Ambas familias de planos están presentes en la superficie lateral de la nanofibra y por su geometría podemos deducir que la longitud de la nanofibra es paralela al eje “z” y por ende esto podría hacernos suponer que las nanofibras crecieron preferencialmente en la dirección [001]. Más observaciones por HRTEM se tendrían que llevar a cabo para corroborar esta suposición.

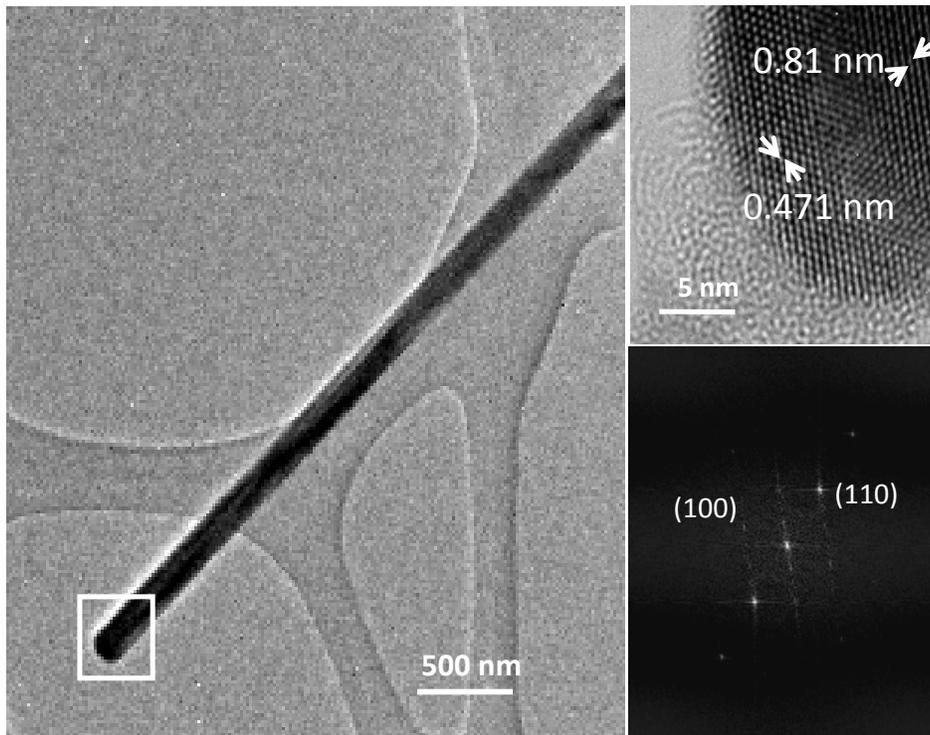


Imagen 12: Imagen de TEM de una nanofibra mostrando su morfología. La fibra es redondeada en los extremos. Una imagen HRTEM de uno de sus extremos es mostrada en la esquina superior derecha. Una FFT de la imagen HRTEM es desplegada también, donde los puntos en la FFT fueron indexados.

La concentración de ácido glutámico junto con las condiciones de reacción usadas para las reacciones de síntesis contribuyen a controlar la morfología y las dimensiones de nanofibras. Es posible que esta sustancia química guíe el crecimiento del cristal para obtener estructuras finas como las nanofibras, nanocintas y nanoplacas.

En cuanto a la estructura cristalina de HAp [mencionado en páginas 11-16], hay dos tipos de iones de calcio. El calcio tipo I está rodeado por nueve vecinos más próximos y el de calcio tipo II tiene un número de coordinación de siete. Varias columnas están formadas por iones de calcio tipo I como se muestra en la figura 27 (esferas grises). Las columnas son paralelas a la dirección [001].

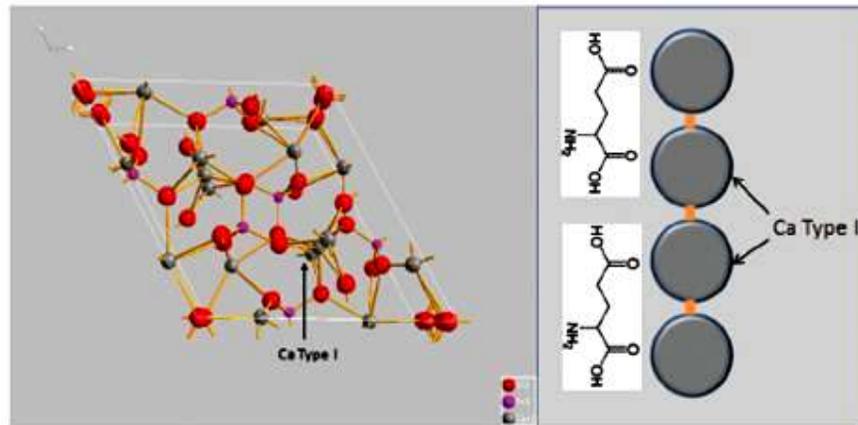


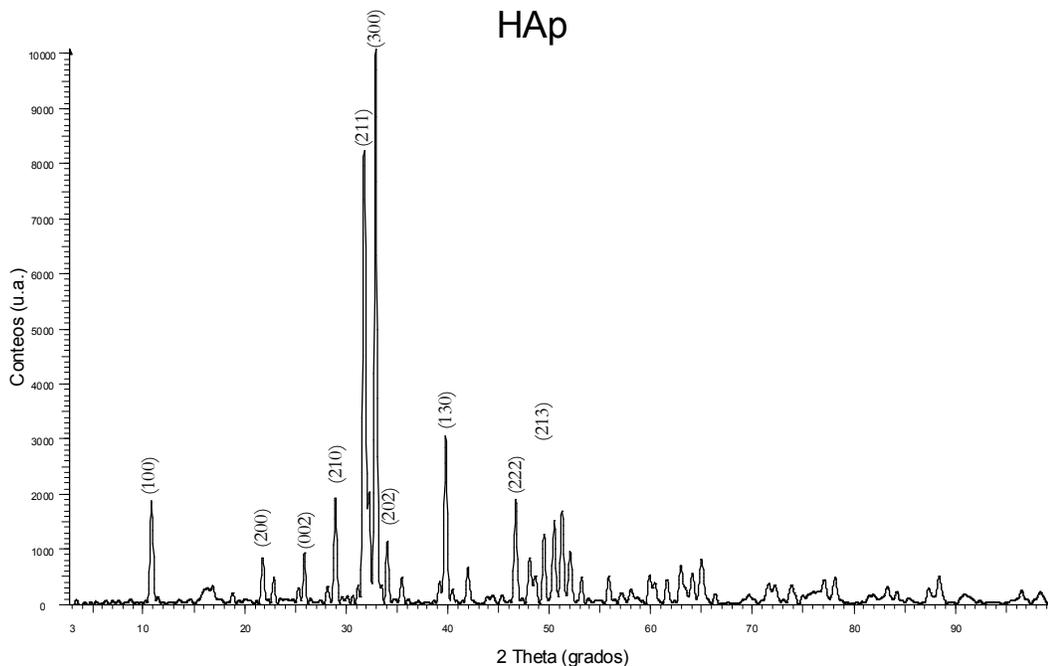
Figura 27: Representación de la estructura cristalina de HAp con Acido Glutámico. El Calcio tipo I interactúa con el grupo carboxilo de la molécula del ácido glutámico para formar el complejo quelato. Estos complejos permanecen sobre la superficie del cristal y pueden influir el crecimiento del mismo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, es posible suponer lo siguiente:

- Los iones de calcio tipo I podrían estar interactuando con los grupos carbonilo del ácido glutámico y generar complejos quelatos. La formación de estos quelatos podría hacer difícil el crecimiento de cristales en las superficies donde se formaron, y entonces podría influir en el hábito de crecimiento de los cristales. Si la concentración de ácido glutámico es baja, algunos iones de Ca en las columnas podría ser libre de la formación compleja y posteriormente, el cristal puede crecer y producir nanoplacas. Cuando la concentración de ácido glutámico se incrementa, la mayoría de los iones de Ca en las columnas es compleja. Esto último podría permitir al cristal a crecer principalmente en la dirección [001] y nanofibras se pueden generar. Experimentos adicionales se están diseñando y llevando a cabo para apoyar esta suposición.

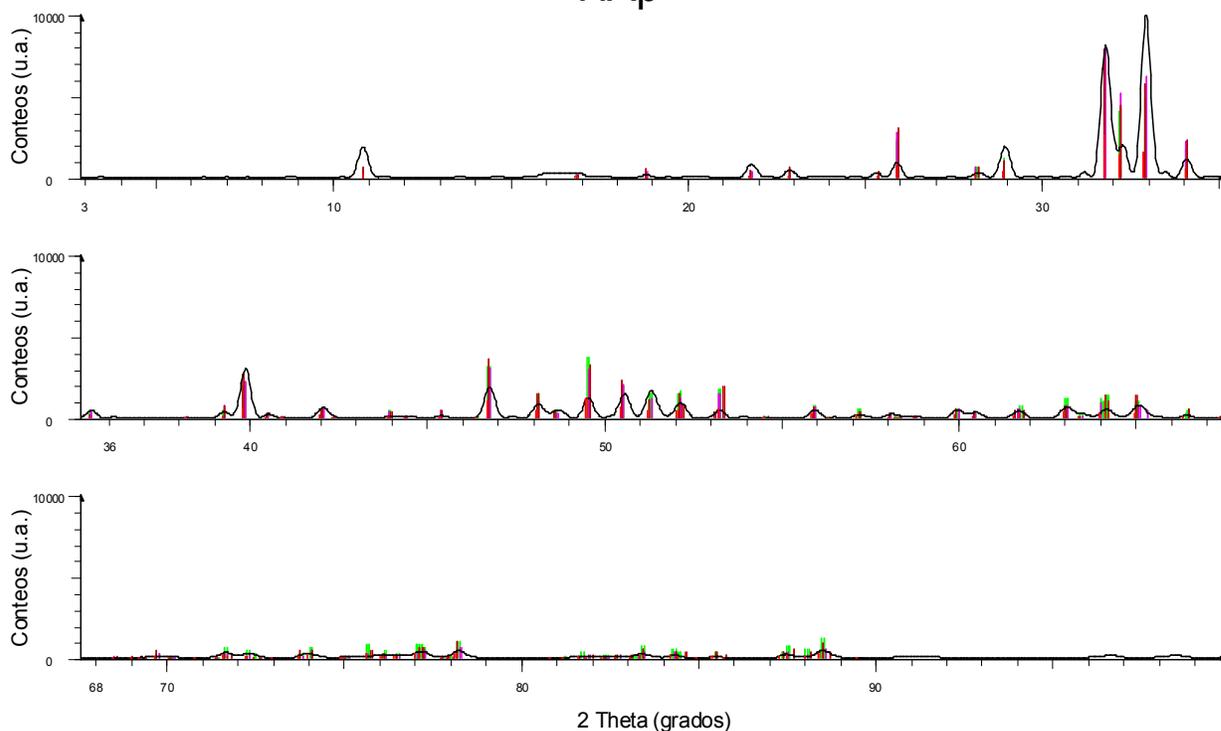
Difracción de rayos X (DRX)

Los resultados de DRX también confirmaron la obtención de cristales de hidroxiapatita sintética. La identificación de fase se realizó por comparación con algunos archivos de difracción de polvo (PDF) que corresponden a diferentes fases de hidroxiapatita sintética. Las fases más similares eran los correspondientes a los PDF 86-1199 y 84-1998. Todas las muestras sintetizadas producida por igual resultados de DRX de que mostraron en espectro 5. El difractograma mostrado en el espectro 5 es análogo al de los PDF arriba mencionados. Algunas diferencias se puede observar. El más relevante es la señal en 39.8° de 2θ que está relacionada con los planos (130). Esta señal es casi igual de intensa que en el correspondiente a 34.08° (202) en el PDF 86-1199 y PDF 84-1998, sin embargo, el pico del difractograma correspondiente a la señal de (130) es mayor que la relacionada con la señal de (202), como puede ser visto en el difractograma 6. Además, la señal en 28.95° asociados a (210) es algo mayor que la señal correspondiente a los planos (100) en 10.82° . Es posible que unos pocos cristales de HAP tengan abundancia relativa de estos planos.



Espectro 5: Difractograma de rayos X de HAp, donde se muestra la identificación de las reflexiones de la HAp cristalina.

HAp



- 73-0293 (C) - Hydroxylapatite - $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ - Y: 26.14 % - d x by: 1. - WL: 1.5406 - Hexagonal - I/lc PDF 1.1 - S-Q 6.8 % -
- 74-0565 (C) - Hydroxylapatite - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - Y: 78.79 % - d x by: 1. - WL: 1.5406 - Hexagonal - I/lc PDF 1.1 - S-Q 20.6 % -
- 84-1998 (C) - Hydroxylapatite - $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ - Y: 78.84 % - d x by: 1. - WL: 1.5406 - Hexagonal - I/lc PDF 1. - S-Q 20.8 % -
- 86-1199 (C) - Hydroxylapatite, syn - $\text{Ca}_9.74(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2.08}$ - Y: 78.84 % - d x by: 1. - WL: 1.5406 - Hexagonal - I/lc PDF 0.9 - S-Q 25.4 % -
- 86-1203 (C) - Hydroxylapatite, syn - $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1.68}$ - Y: 78.79 % - d x by: 1. - WL: 1.5406 - Hexagonal - I/lc PDF 0.8 - S-Q 26.6 % -

Espectro 6: Difractograma de rayos X de HAp, visto completamente extendido en 3 partes (obtenido desde 2.858° hasta 99.898° , con un paso de 0.03°), donde se muestra su correspondencia con respecto a 5 archivos de difracción de polvo (Powder Diffraction Files ó PDF por sus siglas en inglés) que confirma la identificación del material cristalino de HAp. De los cinco PDF detectados por el análisis convencional de difracción de rayos X de polvos, los PDF #86-1199 y PDF # 84-1998 fueron los que más se asemejaron a los difractogramas de rayos X de HAp obtenidos. Debido a que la muestra posiblemente no estaba en el círculo de enfoque, el haz de rayos X no convergió en la posición correcta para el detector en algunos de los picos. La posición de algunos picos obtenidos estuvo desplazada alrededor de 0.08° con respecto a estos PDF. El error de desplazamiento es la mayor fuente de error en una minoría de los datos. Para la identificación de la muestra por esta técnica, se confirma plenamente que corresponde a una estructura cristalina de HAp.

Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Los resultados obtenidos por la técnica de DLS se muestran en la siguiente tabla X:

Tabla X. Parámetros de la medición por DLS, gráfica de resultados y su tamaño promedio de las partículas de HAp, en la cara de las nanoplacas (el espesor menor a 100 nm se considera despreciable).

Condiciones del instrumento durante la medición	Longitud de onda del láser: 633 nm Ángulo de dispersión: 173° Temperatura del porta muestra: 20 °C Índice de refracción (medio): 1.33 (agua) Índice de refracción (muestra): 1.64 (HAp) Conteos (kcps): 150.6 Repeticiones/series: 3/9 (efectuadas en 3 días)			
Concentración y resultados de medición de La muestra	Relación de dilución: $\approx 50/50$ Diámetro promedio: 159.9 nm Desviación estándar: 12.59 nm Polidispersidad: 0.257 RSD%: 7.88 nm			
<div style="text-align: center;"> <p>Record 31: Medicion de particulas de HAp</p> </div>				
Tamaño promedio 159.9 nm		Tamaño (nm)	% Intensidad	Ancho del intervalo (nm)
	Pico 1	171.4	98.5	70.18
	Pico 2	2,622.0	1.5	250.1

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Las síntesis de nanoestructuras de HAp, por medio del método hidrotermal, fueron posibles de obtener utilizando como fuente de energía las microondas. El ácido glutámico tiene una influencia significativa en el crecimiento de cristales de HAp. La morfología de las nanoestructuras de HAp puede ser modificada a través de la variación de la concentración del ácido glutámico principalmente y se puede controlar el tipo de nanoestructura que se obtendrá. Las nanoplacas se obtuvieron a altas concentraciones de ácido glutámico y a medida que disminuye la concentración de ácido glutámico se obtuvieron nanocintas, y con una menor concentración, nanofibras. Las nanoplacas, nanocintas (y muy probablemente las nanofibras) muestran una orientación de crecimiento preferencial de los cristales en la dirección [001].

Las condiciones de reacción utilizadas en esta investigación pudieran ser de gran utilidad para obtener cristales de HAp con orientaciones preferenciales para una posible aplicación especial. En resumen se reporta un método hidrotermal simple y confiable para la síntesis de una cerámica de HAp jerárquicamente nanométrica, con estructura ensamblada tipo flor, a partir de nanoláminas que consisten en bloques de nanocintas. El ácido glutámico se utilizó como un ligando que induce la formación y el autoensamblaje de placas, cintas de HAp a niveles micrométrico y nanométrico. En el caso de las nanofibras, el ácido glutámico a pequeñas concentraciones proporcionó una morfología bien redondeada de las nanofibras, dando la apariencia de nanobarras.

Para obtener una mejor comprensión de los factores que producen partículas con las propiedades deseadas, se requiere más que nada un estudio exhaustivo de cada morfología obtenida. Debido a la baja resolución obtenida en las imágenes por SEM, se hizo imprescindible el uso de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM), ya que con cualquier modelo (Schottky-FE ó Cold- FE) se obtuvieron excelentes imágenes a alta amplificación, dando bastante información al observar a bajos kilovoltajes la topografía superficial. En comparación con los

métodos actuales de síntesis (que son esencialmente demasiado lentos e impredecibles), se puede considerar que el calentamiento por microondas es una tecnología práctica y con significativa reducción de costos, ya que las reacciones por microondas se llevaron a cabo de manera exitosa a temperaturas menores que en los métodos convencionales.

La motivación para el uso de microondas, ha sido el diseño de métodos más limpios, más rápido y económicamente viable de síntesis. Si bien la preparación de HAp se ha logrado, una comprensión del mecanismo de reacción en campo de microondas aún no es satisfactoria. Debido a que es un campo relativamente nuevo de la actividad en química de materiales, hay un creciente volumen de conocimientos empíricos sobre la interacción de las microondas y el material.

En resumen, las perspectivas futuras razonables de esta área de investigación se pueden mencionar a continuación:

- Tomando en consideración los alentadores resultados obtenidos en este trabajo, donde se ha logrado obtener diferentes morfologías de HAp, se pueden proponer una serie de tareas que servirían para completar y profundizar en la caracterización y utilidad práctica de estos materiales. Una de ellas es controlar de una manera más fina la relación molar Ca/P, tamaño de los cristales y la morfología, tratando de conseguir una HAp homogénea (tanto física como químicamente) y altamente cristalina. Una vez obtenida una HAp homogénea, se podría realizar un estudio más detallado del comportamiento del material de HAp.
- Se requiere un estudio más detallado de caracterización fisicoquímica de HAp, preparada a partir de una solución acuosa por microondas. Se necesita llevar a cabo esto empleando diversos métodos y técnicas adicionales a las presentadas en la tesis: análisis químicos (espectroscopia de absorción atómica, colorimetría) y térmicos, microdifracción de rayos X, método Brunauer, Emmett y Teller (BET) de punto triple para área superficial,

determinación de parámetros de la celda unitaria, la cristalinidad, espectroscopia Raman, la solubilidad, etc.

- Con la combinación de materiales de matriz polimérica y de nanopartículas de HAp (utilizado este último como un material de relleno) se puede considerar el empleo de materiales que probablemente permitirían la prevención de caries dental, con una alta relación costo-beneficio, ya que al colocarse sobre las caras oclusales de los molares y premolares, se esperaría que penetrara este material compuesto en las fosas y fisuras, lográndose que películas muy finas sellen y aislen los sitios más vulnerables de la anatomía dentaria, impidiendo así su colonización por los microorganismos bucales causantes de esta enfermedad, con la ventaja de tener mejores propiedades físicas, químicas y biológicas sobre diferentes sellantes comerciales, dado su mayor biocompatibilidad y biofuncionalidad, además de proporcionar una un probable empleo masivo en nuestro país, que no ha sido posible debido al alto costo que presenta en el mercado internacional un material similar. Otro trabajo de investigación futura sería el desarrollo y fabricación de cementos óseos que contengan nanopartículas de HAp, con el fin de unir diferentes tipos de materiales biocompatibles unos con otros, o como material de relleno en fisuras de hueso grandes, reparación de fracturas originadas por traumatismos o lesiones, etc.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] A.Siddharthan *et al.*, Microwave accelerated synthesis of nanosized calcium deficient hydroxyapatite; *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 15 (2004) 1279-1284.
- [2] Hae-Hyoung Lee *et al.*, Preparation of hydroxyapatite spheres with an internal cavity as a scaffold for hard tissue regeneration; *J Mater Sci: Mater Med* (2008) 19:3029-3034.
- [3] Martins Seckler Marcelo, *et al.*, Técnica de Obtención de Hidroxiapatita y otros fosfatos de calcio. Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de Sao Paulo, Brasil.
- [4] Karlis A. Gross *et al.*, Biomedical Application of Apatites. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry. The Mineralogical Society of America*. 2002, v. 48, p. 631-672.
- [5] Rivera-Muñoz Eric *et al.*, Morphological Analysis of Hydroxyapatite Particles Obtained By Different Methods. *Materials Science Forum Vols. 638-642* (2010) pp 681-686.
- [6] Gang Zhang Hui, *et al.* Morphologically Controlled Synthesis of Hydroxyapatite with Partial Substitution of Fluorine. *Multiphase Reaction Laboratory, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences* (2005).
- [7] Markovic Milenko, *et al.* Preparation and Comprehensive Characterization of a Calcium Hydroxyapatite Reference Material. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, Volume 109, number 6, Nov-Dec 2004.
- [8] Guobin Ma, *et al.* Hydroxyapatite: Hexagonal or Monoclinic? *Cristal Growth & Design* 2009. Vol. 9, No. 7 pp 2991-2994.
- [9] Sergey V. Dorozhkin. Nanodimensional and Nanocrystalline Apatites and Other Calcium Orthophosphates in Biomedical Engineering, Biology and Medicine. *Materials* 2009, 2, 1975-2045.
- [10] Biomateriales; Fundamentos, técnicas y aplicaciones. Jorge Campa Molina, Guadalupe Sandra Ulloa Godínez, Lauro Bucio Galindo, Irma A. Belío, Rodrigo Velázquez, Eric M. Rivera Muñoz. Universidad de Guadalajara, primera edición 2007. ISBN 978-970-27-1310-4
- [11] R.N. Panda *et al.* FTIR, XRD, SEM and solid state NMR investigations of carbonate-containing hydroxyapatite nanoparticles synthesized by hydroxide-gel technique; *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 64 (2003) 193-199

