
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE
MATERIALES

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
NANOCRISTALES DE
HIDROXIAPATITA OBTENIDOS POR
EL MÉTODO DE SOL-GEL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
**MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE
MATERIALES**

PRESENTA:

ING. RODRIGO GONZÁLEZ TENORIO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA

MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*“Around here, however, we don’t
look backwards for very long.*

*We keep moving forward, opening up new doors and
doing new things, because we’re curious...
and curiosity keeps leading us down new paths.”*

Walter Disney

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi madre, que es la persona que me ha brindado todo el apoyo necesario, no solo a lo largo de este proceso, sino que desde que tengo uso de razón. Quiero agradecerle por todas esas enseñanzas que en su momento no supe entender ni valorar, pero que ahora me doy cuenta que fueron con el único propósito de guiarme a lo largo del camino y mostrarme la manera correcta de hacer las cosas. Gracias, porque a causa de todos aquellos regaños, lecciones, castigos, enseñanzas, etc., me he convertido en lo que soy ahora y ella es en gran medida responsable de ello. También quiero agradecer a mi tutora, la Dra. Cristina Piña, que sin su ayuda no hubiesen sido posibles tanto la elección, la planeación y la realización de este trabajo. Gracias, porque en los momentos en los que no tenía claro el rumbo que tomaría mi trabajo siempre estuvo disponible para orientarme y ayudarme a corregir el camino.

A continuación quiero nombrar a las personas cuya experiencia y conocimientos en cada una de las técnicas de caracterización contribuyeron a la realización de este trabajo. Gracias a ellos fue posible obtener los resultados de cada una de las pruebas de la mejor manera y quiero agradecerles por su orientación y consejos en la selección de las condiciones adecuadas para cada una de las pruebas realizadas, además de su ayuda en la interpretación de los resultados obtenidos. Ellos son: Ing. Esteban Fregoso Israel encargado de las pruebas de calorimetría diferencial de barrido, M. en C. Adriana Tejeda Cruz encargada de las pruebas de difracción de rayos X, Ing. Carlos Flores Morales encargado de la microscopia electrónica de transmisión y Dr. Omar Novelo Peralta encargado de la microscopia electrónica de barrido, a todos ellos gracias por su invaluable contribución a este proyecto.

Una parte fundamental en cuanto a soporte y apoyo incondicional en los momentos críticos es la familia, y por tanto, quiero agradecer a todos ellos por estar ahí en esos momentos en los que más falta me hacen. Cuando hablo de familia me refiero a mis "parientes", amigos, compañeros de laboratorio, etc., porque estoy seguro que más allá de los vínculos genéticos, lo que realmente identifica y mantiene unida a una familia son los vínculos afectivos. La confianza, la fraternidad y la lealtad son algunos de los valores característicos de las personas a las que reconoces como tu familia. A esas personas que están pendientes de mí, que están dispuestas a brindarme su ayuda, a darme un consejo, o simplemente a escucharme en los momentos complicados y con las que he compartido mis logros, gracias nuevamente por todo el apoyo que he recibido de su parte.

Por último, pero no menos importante, también quiero agradecer a las instituciones que proporcionaron otro tipo de apoyo, y sin el cual, difícilmente se llevarían a cabo este tipo de investigaciones, me refiero a las instituciones que contribuyeron con el apoyo económico. Entre ellas están el CONACyT y el PUCIM, de quienes recibí las becas del programa de posgrado y del R. Rocca education program para cubrir mis gastos personales; a la DGAPA-UNAM por el proyecto IT104011, cuyos fondos, en parte, fueron ocupados para comprar la materia prima utilizada a lo largo de la realización del trabajo; y al PAEP, que me proporciono el viaje y la inscripción al POLYMAT, el congreso donde pude presentar una parte de los resultados de mi investigación.

A todos y cada uno de ustedes que directa o indirectamente contribuyeron a la realización de este trabajo
!!!GRACIAS POR TODO!!!

Índice general

Índice de Figuras	6
Índice de Tablas	7
1. Introducción	8
2. Marco teórico	11
2.1. El hueso	11
2.1.1. Composición y estructura	11
2.2. Tratamiento de lesiones en los huesos	13
2.2.1. Biomateriales	14
2.2.2. Prótesis metálicas	15
2.3. Hidroxiapatita	16
2.4. Métodos de síntesis	17
2.4.1. Hidrotermal	17
2.4.2. Precipitación	18
2.4.3. Método de Sol-Gel	19
2.5. Cristalización	21
2.5.1. Nucleación	22
2.6. Técnicas de caracterización	22
2.6.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	22
2.6.2. Difracción de rayos X (XRD)	24
2.6.3. Microscopía electrónica (TEM y SEM)	28
3. Metodología experimental	33
3.1. Objetivo general	33
3.1.1. Metas	33
3.2. Materiales	33
3.3. Diseño experimental	34

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	4
3.4. Metodología de síntesis	34
3.4.1. Preparación de soluciones	35
3.4.2. Mezclado de precursores	35
3.4.3. Secado de las muestras	35
3.4.4. Calcinación de la hidroxiapatita	37
3.4.5. Lavado de los polvos	37
3.5. Diagrama de flujo	38
4. Resultados, su análisis y su discusión	39
4.1. Calorimetría diferencial de barrido	39
4.2. Difracción de rayos X	42
4.3. Microscopia electrónica de transmisión	50
4.4. Microscopia electrónica de barrido	55
Conclusiones	66
Bibliografía	70

Índice de figuras

2.1. Estructura femur.	12
2.2. Biomateriales en el cuerpo.	14
2.3. Clasificación biomateriales.	16
2.4. Proceso sol-gel	20
2.5. Calorímetro DSC.	23
2.6. Generación de rayos X.	25
2.7. Difractómetro.	26
2.8. Ley de Bragg.	27
2.9. Señales en emitidas.	29
2.10. Esquema del TEM.	30
2.11. Esquema del SEM.	31
3.1. Mezclado por goteo.	36
3.2. Muestra seca.	36
3.3. Muestra calcinada.	37
3.4. Diagrama de flujo.	38
4.1. Dsc HA10.	39
4.2. Dsc HA20.	40
4.3. Dsc HA30.	40
4.4. Rx HA1A.	42
4.5. Rx HA1B.	43
4.6. Rx HA1C.	43
4.7. Rx HA2A.	44
4.8. Rx HA2B.	44
4.9. Rx HA2C.	45
4.10. Rx HA3A.	45
4.11. Rx HA3B.	46

4.12. Rx HA3C.	46
4.13. Rx Comparación HA2B lavada.	49
4.14. Rx Comparación HA3B lavada.	49
4.15. Tem HA1.	51
4.16. Tem HA2.	52
4.17. Difracción de electrones.	53
4.18. Tem HA3.	54
4.19. Sem HA1A.	55
4.20. Sem HA1B.	55
4.21. Sem HA1C.	56
4.22. Sem HA2A.	56
4.23. Sem HA2B.	57
4.24. Sem HA2C.	57
4.25. Sem HA3A.	58
4.26. Sem HA3B.	58
4.27. Sem HA3C.	59
4.28. Sem HA1A4.	60
4.29. Sem HA1B4.	60
4.30. Sem HA2A4.	61
4.31. Sem HA2B4.	61
4.32. Sem HA3A4.	62
4.33. Sem HA3B4.	62
4.34. EDS.	63

Índice de cuadros

2.1. Comparación de métodos de síntesis	21
2.2. Tabla de procesos térmicos	24
3.1. Tabla de seguridad	34
3.2. Diseño experimental	34
4.1. Entalpias	41
4.2. Tamaño de cristales de HA	48
4.3. Relación Ca/P	64

Capítulo 1

Introducción

Desde la antigüedad el hombre ha buscado la manera de satisfacer sus necesidades estudiando su entorno, tratando de comprenderlo y adquiriendo el conocimiento necesario para el desarrollo de nuevas técnicas, tecnología y metodologías indispensables para cubrir dichas necesidades. Uno de los problemas a los que se ha enfrentado, es la necesidad de sustituir partes del cuerpo perdidas en batalla, accidentes o simplemente por alguna deformidad de nacimiento, ya sea con la finalidad de reemplazar la función faltante o simplemente tratando de conservar la estética innata del cuerpo humano.

Lo primero que se utilizó para corregir estos inconvenientes fueron las prótesis, extensiones ajenas al cuerpo humano que se adaptan al mismo para reemplazar o promover, en la medida de lo posible, alguna función perdida. Estas prótesis en un principio eran de diversos materiales (como madera o metales de la época) recubiertos con pedazos de cuero en la parte en contacto con el muñón para protegerlo y no causar un daño mayor, como por ejemplo los garfios o las patas de palo. Después, con el transcurso de los años y la inminente necesidad de reemplazos con mejores características (demandas provenientes principalmente de la rehabilitación de soldados con la pérdida de algún miembro en el campo de batalla), se comenzaron a desarrollar prótesis mecánicas que además tenían un grado mayor de movilidad, comodidad y estética provenientes de la inclusión de materiales plásticos en la fabricación de suspensiones y recubrimientos para estos sustitutos. En la actualidad se ha incorporado al desarrollo protésico el empleo de dispositivos electrónicos con la finalidad de devolverle al paciente la funcionalidad total del miembro perdido.

En el caso de que el daño a los órganos del paciente no fuera tan grave como para proceder a la amputación del miembro, se desarrollaron prótesis internas, prótesis que se colocan dentro del cuerpo. Este tipo de sustitutos debían elaborarse con materiales especiales, materiales que fuesen capaces de “coexistir” con los órganos del cuerpo, cumpliendo las funciones para las que fueron diseñados sin causar algún tipo de daño al organismo. A este tipo de materiales se les conoce como biomateriales.

Podemos definir como biomaterial a cualquier material o combinación de éstos, de origen natural o sintético, diseñados para interactuar con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del cuerpo humano [1]. Una característica fundamental para considerar a un material cualquiera como biomaterial, es el grado de tolerancia por parte de los tejidos del cuerpo hacia éste, es decir; su biocompatibilidad, o la capacidad que tiene el material de desarrollar, en condiciones óptimas, la función interna para la cual ha sido diseñado sin provocar una respuesta negativa en el organismo [1]. La determinación de la biocompatibilidad de un biomaterial para cada aplicación específica, requiere de la realización de una serie de ensayos de acuerdo con protocolos preestablecidos y con el posterior análisis de los resultados obtenidos.

En la actualidad existen cuatro tipos de biomateriales de uso común: los poliméricos, los metálicos (incluyendo sus aleaciones), los cerámicos y los biomateriales compuestos. Entre los metálicos, el oro y la plata fueron los primeros en utilizarse en aplicaciones biomédicas como la reparación dental, y más tarde los hilos de hierro se utilizaron para la inmovilización de fracturas óseas. Los avances tecnológicos como el desarrollo de la anestesia y la cirugía en condiciones estériles dieron impulso a la búsqueda de nuevos metales que pudieran usarse en el interior del cuerpo. Pero al poco tiempo de la aplicación de metales para éste propósito, se descubrieron sus inconvenientes, que radicaban básicamente en la carencia de propiedades mecánicas necesarias para que los dispositivos cumplieran adecuadamente con sus funciones y en el desprendimiento de iones tóxicos para el organismo producto de la corrosión propia de los metales. Para superar estos inconvenientes se investigaron nuevas aleaciones metálicas, entre las que cabe mencionar las de cromo-cobalto y los aceros inoxidable del tipo 302 (con 9 % de níquel y 18 % de cromo). Luego, se mejoró la resistencia a la corrosión de los aceros mediante la incorporación de 2 % a 4 % de molibdeno. Después, se redujo la cantidad de carbono en estos aceros inoxidables a menos del 0.03 % (acero inoxidable 316L), con lo que se logró una importante mejoría adicional. Posteriormente, la introducción del titanio y sus aleaciones con aluminio y vanadio, extendió el campo de aplicación de los metales dentro de la medicina.

Con el fin de reducir al máximo la liberación de iones por corrosión, estos metales comenzaron a ser recubiertos con hidroxiapatita (HA), obteniendo una notable mejoría, además de observar que éste material proporcionaba mayor biocompatibilidad y aceleraba la cicatrización del hueso [2]. La hidroxiapatita sintética, cuya fórmula química es $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, es uno de los biomateriales cerámicos más estudiados debido a que es una sustancia estructuralmente similar al componente inorgánico presente en los huesos y a su excelente biocompatibilidad. Aunque se trata de un biomaterial, también se utiliza para propósitos no biomédicos como adsorbente y como catalizador.

Dentro de sus aplicaciones biomédicas la hidroxiapatita se usa, como se comentó previamente, para recubrir prótesis hechas con aleaciones metálicas (de titanio o aceros inoxidables) mediante varios métodos, como la

electrodeposición, el termorrociado (HVOF) o la deposición química (CVP), con la finalidad de mejorar tanto la bioactividad como la osteointegración del sustituto [2]-[6]. Pero además, también se ha buscado propiciar la porosidad que puede presentar este material, ya que mediante los diferentes métodos de síntesis que se tienen (sol-gel, precipitación, hidrotermal, combustión), es posible controlar tanto el tamaño de las partículas obtenidas como el diámetro promedio de los poros que se presentan, convirtiéndola en un material ideal para la adsorción y liberación controlada tanto de sustancias biológicamente activas (principalmente proteínas) como de fármacos [7]-[16]. Esta capacidad de adsorber moléculas y alojarlas en sus poros no sólo se aprovecha en el área biomédica, ya que también se ha estudiado la posibilidad de emplearla en forma de membranas para la adsorción de metales pesados en el tratamiento de efluentes, además de utilizarse en la catálisis heterogénea para la obtención de sustancias como el butanol y las chalconas [17]-[22]. Otra importante aplicación para la hidroxiapatita sintética es utilizarla como andamio para la regeneración del tejido óseo [23]-[25]. Si se desea corregir algún defecto óseo, se han desarrollado materiales compósitos de hidroxiapatita y polímeros bioactivos que proveen al andamio mayor osteoconductividad y promueven la regeneración del tejido dañado (siempre y cuando el defecto no sea grande).

En lo que respecta a su preparación, la hidroxiapatita puede obtenerse de manera natural, a partir de corales o de huesos de animales, o bien, de manera sintética por medio de diferentes métodos de síntesis química, como la precipitación, el método de combustión, el método hidrotermal o el método sol-gel, que es el que se utiliza en este trabajo debido a las ventajas que presenta en comparación con los otros métodos, siendo de las más importantes el tiempo total de preparación (alrededor de 18 horas) y el ahorro de energía, ya que esta reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente (o a temperaturas no mayores a los 60 °C), aunque también cabe mencionar que este método de síntesis presenta algunos inconvenientes, como la manipulación de solventes, los mecanismos de reacción son complejos y a menudo los precursores que se utilizan son costosos. A pesar de esto, se tiene la posibilidad del diseño y procesamiento de materiales de HA con características que mejoren su desempeño y promuevan su aplicación no sólo en el campo de la medicina, sino también en la cromatografía y en el diseño de adsorbentes en general.

En este trabajo se estudió la variación del tamaño de los cristales de hidroxiapatita (obtenidos mediante el tratamiento térmico del fosfato de calcio sintetizado por el método de sol-gel), con la finalidad de encontrar las condiciones ideales para la obtención de cristales de tamaño nanométrico (entre 1 y 100 nm) y de obtener un material potencialmente biocompatible para su posterior aplicación en el área biomédica, principalmente para el recubrimiento de prótesis metálicas.

Capítulo 2

Marco teórico

2.1. El hueso

Los huesos son las unidades básicas que componen al esqueleto, contienen más del 99 % del calcio del organismo y su importancia recae en tres funciones principales que son el sostén del cuerpo, la homeostasis del calcio y la protección de órganos cefálicos y torácicos [26]. El componente principal de los huesos es el tejido óseo, el cual se deriva de un tejido conectivo denso muy especializado que posee cierta elasticidad, y al estar calcificado se caracteriza por su rigidez y resistencia. Macroscópicamente éste tejido se organiza de dos maneras formando igual número de estructuras, que son; el hueso esponjoso, que se localiza en el interior de los huesos y, el hueso cortical, que se encuentra al exterior de los mismos. El hueso esponjoso está formado por trabéculas, mientras que el hueso cortical se conforma por láminas de hueso dispuestas en sistemas de osteonas. A su vez, el hueso está cubierto por tejido conectivo laxo vascularizado con osteoblastos y una capa externa fibrosa formando el periostio; mientras que internamente se recubre por el endostio, una capa interna formada por células endósticas que recubre el espacio medular, los espacios de la sustancia esponjosa y los conductos de Havers y Volkmann como se muestra en la figura 2.1 [26].

2.1.1. Composición y estructura

La composición de los huesos depende de un gran número de factores: la especie, tipo de hueso, la ubicación de donde se toma la muestra, la edad, sexo, tipo de tejido óseo, etc. Sin embargo, una estimación aproximada de la composición total del volumen es un tercio de cristales de apatita (AP), un tercio de colágena y otros componentes orgánicos, y un tercio de agua [27].

Tejido duro, tejido mineralizado y tejido calcificado a menudo son utilizados como sinónimos de hueso cuando se describe la estructura y propiedades de los huesos o los dientes. El empleo del término “tejido duro” es claro al compararlo con los demás tejidos de los mamíferos, que comúnmente se conocen como tejidos blandos.

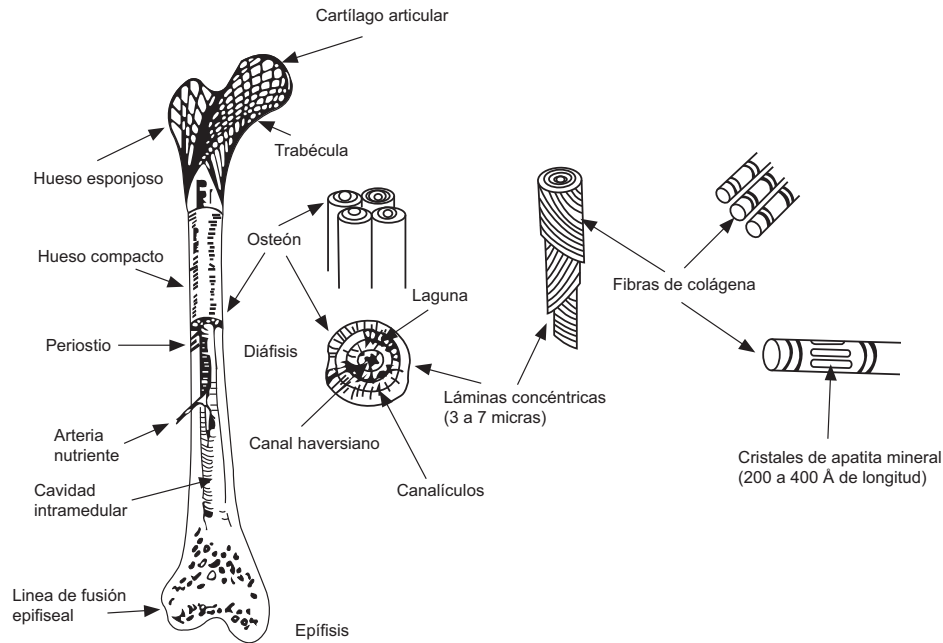


Figura 2.1: Organización estructural del fémur.

El uso de los términos mineralizado y calcificado surge del hecho de que, además de la proteína principal, la colágena y otras proteínas, glicoproteínas y polisacáridos, que comprenden alrededor del 35 % del volumen de los huesos, el principal constituyente de éstos es un fosfato de calcio (de ahí el término calcificado) en forma de apatita cristalina (de ahí el término mineralizado) [27].

Independientemente de su función biológica, el hueso es uno de los materiales más interesantes conocido en términos de relaciones estructura-propiedades. El hueso es un material anisotrópico, heterogéneo y viscoelástico. Para los huesos largos que soportan el peso, la característica más importante de su tejido es la rigidez.

La complejidad de las propiedades del hueso surge de la complejidad en su estructura. Es importante comprender la estructura de los huesos con el fin de apreciar las propiedades relacionadas. En la figura 2.1 se presenta un diagrama que muestra la estructura de un fémur humano a diferentes niveles. Para mayor comodidad, las estructuras que se muestran en dicha figura se pueden agrupar en cuatro niveles. En la unidad más pequeña de la estructura tenemos la molécula de tropocolágena y los cristalitas de apatita asociados. La molécula de tropocolágena es de aproximadamente 1.5 nm por 280 nm, se compone de tres cadenas individuales con levógiro denominadas cadenas alfa y a su vez, éstas cadenas se encuentran enrolladas en una triple hélice dextrógira [27]. Los cristales de AP son de alrededor de 4 x 20 x 60 nm de tamaño. Este nivel es el molecular. Al siguiente nivel lo llamamos ultraestructural. En este caso, la colágena y la AP están íntimamente relacionados y montados en un compuesto microfibrilar, varios de los cuales son ensamblados en las fibras de aproximadamente 3 a 5 micras de espesor. En el siguiente nivel, el microestructural, estas fibras están dispuestas al azar

(tejido óseo) u organizadas en grupos concéntricos laminares (osteonas) o grupos de láminas lineales (hueso plexiforme). Este es el nivel estructural al que usualmente nos referimos cuando hablamos de las propiedades del tejido óseo. Además de las diferencias en la organización laminar a este nivel, también hay dos tipos de estructura arquitectónica. El tipo de hueso denso que se encuentra, por ejemplo, en la diáfisis de huesos largos, es conocido como hueso compacto o cortical. Un tipo de hueso más poroso o esponjoso se encuentra, por ejemplo, en los extremos articulares de los huesos largos y se llama hueso esponjoso. Es importante tener en cuenta que el material y la organización estructural de colágena-AP que componen el hueso Haversiano y al hueso plexiforme son los mismos que el material que compone el hueso esponjoso [27].

Por último, tenemos que todo el hueso se construye de osteonas y porciones de osteonas parcialmente destruidas (llamadas laminillas intersticiales) en el caso de los seres humanos o de osteonas y/o hueso plexiforme en el caso de los mamíferos. Esto es lo que denota el nivel macroestructural. Las propiedades elásticas de todo el hueso resultan de la contribución jerárquica de cada uno de estos niveles.

2.2. Tratamiento de lesiones en los huesos

Los huesos se clasifican en 4 grupos; los huesos largos, los huesos cortos, los huesos planos y por último los huesos irregulares. Así como cada uno de éstos grupos de huesos tiene características especiales, los padecimientos que se presentan en cada uno de ellos tiene sus particularidades, al igual que la manera en la que se trata de sanarlos.

Una manera muy general, pero conveniente para el propósito de este trabajo, de clasificar los padecimientos que se presentan en los huesos es por el tipo de tratamiento que se les da, esto es, si requieren o no de algún tipo de intervención quirúrgica. Entre los padecimientos más comunes en los huesos y que se tratan mediante fármacos y terapia de rehabilitación, encontramos la osteogénesis imperfecta, la osteopetrosis, la osteoporosis y la osteítis deformante. Por otra parte, las lesiones óseas en las que se requiere de la intervención quirúrgica y, por consiguiente de algún tipo de prótesis, se deben principalmente a algún tipo de tumor o a la fractura del órgano, y entre las más comunes tenemos la osteonecrosis, la osteogénesis imperfecta, la osteomielitis, los osteomas, los osteoblastomas, la osteoartritis y la artritis reumatoide, siendo estas dos últimas, enfermedades que afectan las articulaciones (principalmente al cartílago articular)[28].

Sin importar el tipo de hueso o el tipo de trauma que se quiera sanar, lo que es seguro es que los dispositivos que se utilizaran en el proceso deberán elaborarse con materiales especiales. Estos materiales deben ser capaces de “coexistir” con los órganos del cuerpo, cumpliendo las funciones para las que fueron diseñados sin causar algún tipo de daño al organismo. A este tipo de materiales se les conoce como biomateriales.

2.2.1. Biomateriales

Motivado por el aumento de la esperanza de vida en la población y la mejora en la calidad de la misma, el campo de los biomateriales ha experimentado un espectacular avance en los últimos años. El objetivo general de los biomateriales es la regeneración y/o reparación funcional de tejidos y órganos lesionados o destruidos. Dicho objetivo requiere del diseño de materiales capaces de modular la respuesta biológica del tejido receptor, dando lugar en algunos casos a la regeneración y a la neoformación de tejidos degradados y, en otros, a una perfecta integración del biomaterial y a la recuperación funcional perdida. En la actualidad existen numerosos dispositivos diseñados para sustituir una gran cantidad de partes del cuerpo, como los dientes, el codo, la cadera, el corazón, las rodillas, las manos, la piel, etc., y algunos de éstos se muestran en la figura 2.2.

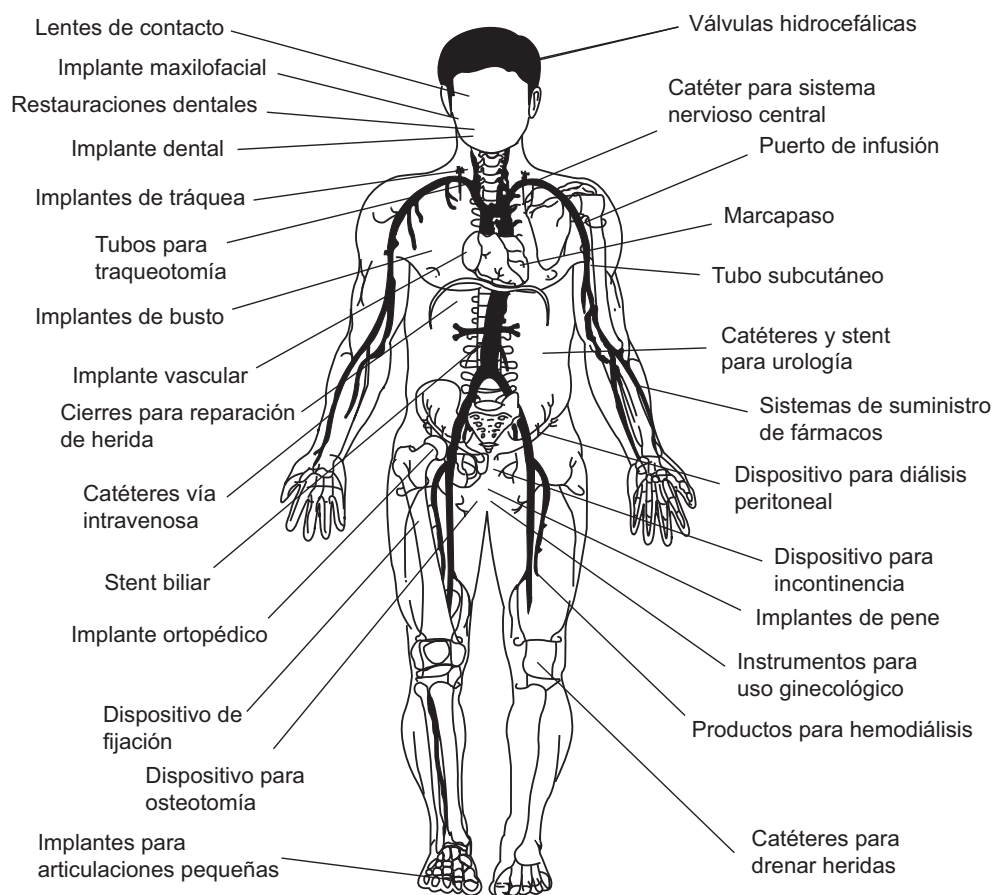


Figura 2.2: Biomateriales que actualmente se pueden incorporar en el cuerpo.

En 1991 se realizó en Chester (Reino Unido) una conferencia convocada por las diferentes sociedades internacionales de biomateriales con el propósito de encontrar consenso en algunas definiciones comunes, y en la que se aprobó la de Biomaterial como: *cualquier material o combinación de éstos, de origen natural o sintético, diseñados para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir*

algún tejido, órgano o función del cuerpo humano [1]. Una característica fundamental para considerar un material cualquiera como biomaterial, es el grado de tolerancia por parte de los tejidos del cuerpo hacia éste, es decir; su biocompatibilidad. La biocompatibilidad de un biomaterial es la capacidad que tiene el material de desarrollar, en condiciones óptimas, la función interna para la cual ha sido diseñado sin provocar una respuesta negativa en el organismo [1]. La determinación de la biocompatibilidad de un biomaterial para cada aplicación específica, requiere de la realización de una serie de ensayos de acuerdo con protocolos preestablecidos y del posterior análisis de los resultados obtenidos.

Existen varias formas de clasificar los biomateriales, una de ellas es atendiendo a su origen, es decir, si se implanta un biomaterial en el cuerpo prácticamente tal y como se obtiene de la naturaleza y se trata en menor grado sin cambiar sus propiedades (únicamente con objeto de asepsia), entonces se dice que se trata de un biomaterial de origen natural. Si por el contrario, el material se obtiene del producto de una reacción química con el objetivo de modificar sus propiedades y de garantizar su biocompatibilidad, entonces se trata de un biomaterial de origen sintético.

También podemos encontrar biomateriales de tipo bioestable, es decir, con carácter permanente, particularmente útiles para sustituir parcial o totalmente tejidos u órganos lesionados o destruidos. Además, tenemos los biomateriales de tipo biodegradable, esto es, con carácter temporal y con una funcionalidad adecuada durante un tiempo limitado (el tiempo necesario mientras el problema subsista).

Otra manera de clasificar los biomateriales es tomando en cuenta la interacción que éstos tienen con los tejidos y órganos circundantes al implante. En esta clasificación tenemos dos tipos de biomateriales, los bioactivos y los bioinertes, siendo los bioactivos aquellos que promueven las actividades biológicas específicas para las que son diseñados, mientras que los bioinertes se caracterizan por la falta de reacción por parte de los tejidos del organismo al estar en contacto con este tipo de materiales.

En la figura 2.3 se muestra un diagrama resumen que nos ayudará a comprender mejor las distintas formas de clasificar los biomateriales y la relación que se puede presentar entre cada una de ellas, además de proporcionarnos un ejemplo de cada una de las combinaciones posibles.

2.2.2. Prótesis metálicas

Cuando se requiere del reemplazo de huesos cuya principal función es la del sostén del cuerpo y cuya característica fundamental es la resistencia a las cargas a las que se encuentran sometidos en el cuerpo, los biomateriales que se utilizan con dicho propósito y que tienen las propiedades necesarias para cubrir estas necesidades son los metálicos.

mayor a 1500 °C, además de proporcionarle la propiedad de insolubilidad. En general, las propiedades de la HA varían de acuerdo con el proceso de manufactura. Cuando se obtiene hidroxiapatita sintética, se deben controlar algunos parámetros como son el pH, la temperatura de la reacción, el tiempo de reacción, la atmósfera de tratamiento, entre otros, con la finalidad de controlar su composición, las impurezas, la morfología, el grado de cristalinidad y el tamaño de los cristales. La variación de dichas propiedades, por pequeña que sea, puede ocasionar diferentes comportamientos del material implantado, tanto en su bioactividad y en el rango de disolución, como en la reabsorción del mismo.

Aunque la mayor aplicación de este material se encuentra en el área biomédica, también se usa en otras áreas, como por ejemplo en el tratamiento de efluentes en las aguas residuales, en la cromatografía como catalizador, o simplemente como adsorbente. Dentro del área biomédica, la HA se puede usar como reemplazo de partes pequeñas de hueso, como relleno de cavidades en odontología, para el refuerzo de materiales compuestos, para la liberación controlada de sustancias biológicamente activas, etc. Una de las principales aplicaciones de este material se encuentra en el recubrimiento de prótesis metálicas con el fin de proveerle al sustituto mayor biocompatibilidad y osteointegración, además de disminuir considerablemente la liberación de iones, producto de la corrosión propia de los materiales, al organismo. De aquí la importancia de obtener HA con las características adecuadas para su implantación, mediante métodos de síntesis con mayor eficiencia en cuanto a tiempo, costo y calidad del material obtenido.

Para una aplicación determinada se necesitan materiales de hidroxiapatita con ciertas características químicas y estructurales, las cuales pueden controlarse mediante los distintos métodos de síntesis química que se conocen.

2.4. Métodos de síntesis

2.4.1. Hidrotermal

La síntesis hidrotermal permite obtener polvos de hidroxiapatita con alto grado de cristalinidad y una relación Ca/P cercana al valor estequiométrico. Una ventaja de este proceso se encuentra en las temperaturas relativamente bajas de tratamiento térmico, esta técnica de síntesis suele potenciarse mediante el uso de 8 microemulsiones y de ese modo, resulta muy versátil en la obtención de nanopartículas de hidroxiapatita con una relación Ca/P estequiométrica y morfologías muy variadas. La síntesis hidrotermal ha sido definida en términos generales como una tecnología para la cristalización de materiales y compuestos químicos directamente de solución acuosa mediante el control adecuado de ciertas variables, tales como la temperatura, la presión, la composición química, la agitación, etc. [29].

Algunos autores enfatizan en que el término hidrotermal hace referencia a una reacción química homogénea o heterogénea en presencia de un solvente (en medio acuoso o no acuoso) y llevada a cabo, a una temperatura por encima de la ambiental y presión superior a la atmosférica, en un sistema cerrado [29]. La síntesis hidrotermal se realiza usualmente a presión autógena, que es la presión de vapor saturado de la mezcla hidrotermal a una determinada temperatura y composición.

El uso de microemulsiones es de gran interés en la síntesis hidrotermal de hidroxiapatita, en particular, aquellas microemulsiones que favorecen la formación de micelas inversas. Una característica importante de las micelas inversas es que dentro de sus ambientes acuosos de tamaño nanométrico se pueden llevar a cabo reacciones químicas, actuando así como nanoreactores. Además, el tamaño del ambiente acuoso puede controlarse con varios parámetros como la fuerza iónica, la concentración del surfactante y en particular, la relación molar agua/surfactante [29]. Por lo anterior, la confinación de precursores al interior de micelas inversas, seguido de un tratamiento hidrotermal puede permitir la obtención de nanopartículas de hidroxiapatita de tamaño controlado y alto grado de cristalinidad.

2.4.2. Precipitación

En primer lugar, un precipitado es un sólido que se produce en una disolución por efecto de difusión o de una reacción química. A este proceso se le conoce como precipitación. Estos precipitados se pueden presentar cuando una sustancia insoluble se forma en una disolución debido a una reacción química o a que la disolución ha sido sobresaturada por algún compuesto, es decir, que no acepta más soluto y que al no poder ser disuelto, dicho soluto produce un precipitado. En la mayoría de los casos, el precipitado cae al fondo de la disolución, aunque esto depende de la densidad del precipitado.

Una forma de obtener hidroxiapatita por precipitación es a partir de la mezcla de hidróxido de calcio con ácido fosfórico, cuyo proceso se divide en 6 etapas y se describe a continuación.

En primer lugar se tiene la mezcla de las soluciones acuosas de hidróxido de calcio y de ácido fosfórico, teniendo cuidado en el control del pH de la solución, manteniéndolo entre 11 y 12. La siguiente etapa es la del reflujo, donde lo que se busca es activar la reacción química mediante el incremento en la temperatura de la misma, llevándola hasta un valor cercano a los 90 °C para limitar la evaporación del agua. A continuación sigue el envejecimiento de las muestras, esta etapa es en la que se forman los precipitados de hidroxiapatita y es la que más tiempo tarda (alrededor de 72 horas). El envejecimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente y consiste en el intercambio iónico de los precursores, por lo que se identifica en un diagrama de solubilidad para la hidroxiapatita el pH de la solución necesario para su formación y se espera hasta que el sistema llegue a estas condiciones. Después de la formación de los precipitados sigue el filtrado, para separar la hidroxiapatita, en estado sólido, del resto de la solución, con la ayuda de un papel filtro y un poco de agua destilada, esta última

con el fin de eliminar los remanentes de los reactivos utilizados. Los sólidos del precipitado se calientan en un horno a 110°C por espacio de 3 horas con la finalidad de eliminar el agua presente en las mismas (secado). Por último, se procede a la calcinación de las muestras a temperaturas de entre 800°C y 1200°C, durante 5 horas [30]. En raras ocasiones los productos de la precipitación son puros, en general se obtienen impurezas o compuestos no deseados. Esto se debe a que durante la reacción química se presenta coprecipitación, que implica la nucleación de dos o más compuestos en un mismo sistema cristalino [30].

2.4.3. Método de Sol-Gel

El proceso sol-gel es una técnica muy utilizada en la síntesis de materiales cerámicos debido a que presenta varias ventajas, como:

- Incrementa la homogeneidad química a escala nanométrica. Utilizando soluciones coloidales alcohólicas se pueden controlar las sustancias inorgánicas a nivel molecular, mientras que en soluciones acuosas, la homogeneidad se presenta a nivel atómico.
- Se pueden aplicar tratamientos térmicos a menores temperaturas y se pueden producir polvos con gran área superficial.
- Se obtienen productos químicos con un elevado grado de pureza.
- Además de los cerámicos, también se pueden sintetizar materiales compuestos y vítreos.
- Se pueden obtener productos en diferentes formas, como polvos, fibras, granos, películas, recubrimientos, esferas, geles amorfos, etc.

Sin embargo, el proceso sol-gel presenta las siguientes desventajas:

- Mecanismos químicos complejos.
- Precursores a menudo muy caros.
- Manipulación de solventes.
- Residuos carbonaceos en los productos, difíciles de eliminar

Este proceso comprende varias transformaciones tanto físicas como químicas. En la figura 2.4 se muestran las etapas involucradas en el procedimiento.

El proceso sol-gel recibe su nombre de la transición que se produce de una solución coloidal a otra, es decir, de *sol* a un *gel*, aunque durante el proceso es muy difícil distinguirlas debido a que las reacciones químicas se efectúan consecutivamente [30]. Un *sol* es una solución coloidal en la que la fase continua (la que se encuentra en mayor proporción) es una sustancia en estado líquido, y la fase dispersa (la que se encuentra en menor

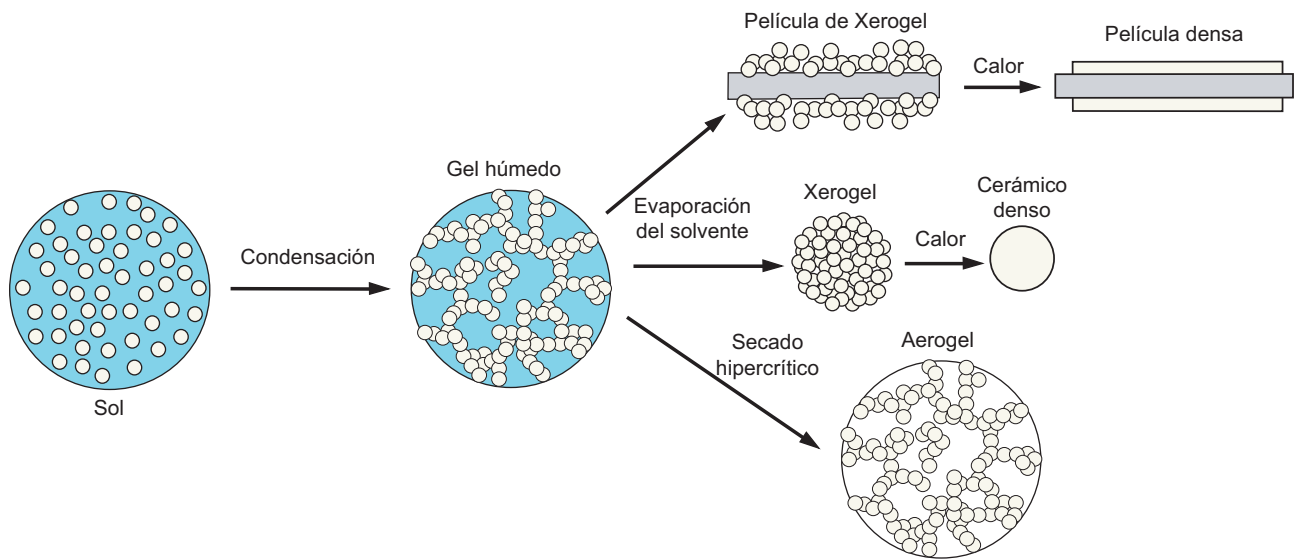


Figura 2.4: Descripción de las etapas del proceso sol-gel.

proporción) es otra sustancia en estado sólido. Por otra parte, un *gel* también es una solución coloidal, pero en este caso la fase continua se encuentra en estado sólido, mientras que la fase dispersa se encuentra en estado líquido.

Las reacciones de hidrólisis y de condensación son las que se llevan a cabo para formar el sol y el gel, respectivamente. En la mayoría de los casos estas reacciones se llevan a cabo a temperatura ambiente. El mecanismo y la velocidad de la reacción se pueden alterar fácilmente modificando las condiciones del proceso, como la temperatura, el pH (para el caso de las soluciones acuosas), el solvente empleado, la cantidad de reactivos usados, los precursores empleados, la presión del sistema, etc.

Una vez obtenido el gel, se debe secar para remover la fase líquida, por lo que es necesario aplicarle un tratamiento térmico. Si éste tratamiento térmico consiste solamente en el incremento de la temperatura del gel en un horno convencional a presión atmosférica, entonces, el producto obtenido se conoce como xerogel. En cambio, si el proceso se realiza en una autoclave a condiciones críticas de presión y temperatura, el material resultante se conoce como aerogel [30]. Por último, se puede emplear un tratamiento adicional con el fin de densificar el material y disminuir la energía libre superficial. A este tratamiento se le conoce como calcinación y nos ayuda a obtener materiales densos y cristalinos.

En la tabla 2.1 se presenta la comparación de las características de cada uno de estos métodos de síntesis.

Tabla 2.1: Comparación de los métodos de síntesis de hidroxiapatita.

Proceso	Tiempo total del proceso	Costo de los precursores	Tamaño de los cristales obtenidos	Pureza de las muestras	Tratamientos adicionales
Hidrotermal	36 hrs	500 g de $(NH_4)_2HPO_4$ \$1200, 500 g de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ \$900 y 100 g de CTAB \$1700	50 nm - 100 nm	Alto grado de pureza, con la presencia de algunos componentes orgánicos residuales	Tratamiento térmico y lavado de las muestras con agua y etanol
Precipitación	85 hrs	500 g de $Ca(OH)_2$ \$1800 y 500 g de H_3PO_4 \$800	300 nm - 500 nm	Alto grado de pureza	Tratamiento térmico (calcinación)
Sol-gel	24 hrs	500 g de P_2O_5 \$1400 y 500 g de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ \$900	50 nm - 1 μm (dependiendo de la temperatura de calcinación)	Alto grado de pureza, con la presencia de un pequeño porcentaje de óxido de calcio	Tratamiento térmico (calcinación) y lavado de los polvos con agua destilada

2.5. Cristalización

La cristalización es el proceso de formación de sólidos cristalinos a partir de alguno otro de los estados de agregación de la materia. Durante la cristalización, los iones que se encuentran disueltos forman enlaces entre ellos, constituyendo así un sólido cristalino.

Mediante este proceso es posible separar alguno de los componentes de una solución líquida, variando las características de la solución de manera que los cristales de la sustancia que se busca precipiten. Este proceso depende de la constante de equilibrio K_{ps} . Esta constante es una medida de la solubilidad de un compuesto iónico en determinada solución, por lo que, cuanto menor sea su valor, menor será la solubilidad de ese compuesto y, si el valor de esta constante es menor al valor del producto de solubilidad de la solución, se produce la precipitación del exceso de concentración. Es así como se sintetizan muchos de los productos que se presentan como cristales, entre ellos el cloruro de sodio (NaCl), el azúcar o sacarosa, etc. Existen diversos métodos para cristalizar sustancias, como la cristalización por enfriamiento de una solución de concentración baja, que consiste en preparar una solución concentrada a alta temperatura, para posteriormente enfriarla, con lo que la disolución llega a un punto de sobresaturación en el cual el soluto es más que el admisible por la disolución a esa temperatura y el material disuelto en ella precipita en forma de cristales. Este procedimiento proporciona como resultado materiales puros, y tiene mejores resultados mientras mayor sea la solubilidad del compuesto en función de la temperatura.

Otro método para cristalizar es mediante la evaporación del disolvente, y funciona básicamente con el mismo

principio que el anterior. Al evaporar el solvente se alcanza una mayor concentración del soluto en la disolución, lo que conlleva a una cristalización del compuesto principal. Este método es el que se usa para este trabajo. El último método que mencionaremos en esta sección será el de cambio de disolvente, en este método se agrega a la solución un disolvente que sea miscible con el primero, pero que la solubilidad del soluto en él sea menor que en el primero, de manera que el sólido cristalice y precipite.

El proceso de cristalización debe empezar en una pequeña región del espacio, en lo que se conoce como un núcleo. La cantidad de puntos de nucleación que existan en la solución en la cual se está llevando a cabo el proceso de cristalización determinará posteriormente la rapidez de cristalización y el tamaño final de los cristales obtenidos. Sin embargo, la nucleación está presente no sólo en la formación de cristales, sino en muchos otros fenómenos de la naturaleza en los cuales exista un cambio en el estado de agregación de la materia.

2.5.1. Nucleación

La nucleación es el punto de inicio de un cambio de fase de una sustancia en una región del espacio. La existencia de un punto de nucleación lleva consigo un aumento en la energía del sistema, debido a la creación de una frontera entre las dos fases de la sustancia. Esta energía depende de la naturaleza de las sustancias y de la cantidad de material que está agregándose en el nuevo estado.

Para que este proceso se lleve a cabo, es necesario que existan fluctuaciones en el sistema, de hecho, las fluctuaciones existen en todos los sistemas (incluso en los estables) y consisten en una alteración del equilibrio local que produce un aumento en la energía termodinámica del sistema.

Por cuestiones estadísticas, en cualquier sistema es más probable que ocurran fluctuaciones pequeñas que grandes. En el caso de la nucleación, una fluctuación se puede entender como el choque o el encuentro de una cierta cantidad de moléculas para agregarse en un estado diferente. Desde el punto de vista estadístico, es evidente que un choque entre 2 moléculas cualesquiera ocurrirá con mayor frecuencia que un choque entre grupos de 10 moléculas.

2.6. Técnicas de caracterización

2.6.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido o DSC (por sus siglas en inglés Differential Scanning Calorimetry) mide el cambio de flujo de calor hacia y desde el material a una referencia en función del tiempo o de la temperatura. Los equipos de DSC consisten en dos cámaras y cada una contiene un crisol. Los crisoles están fabricados de

diferentes materiales, el más utilizado es el crisol de aluminio el cual trabaja hasta una temperatura no mayor a los 600°C, por arriba de esta temperatura se utilizan crisoles de Au, C, Pt, Ag y acero inoxidable.

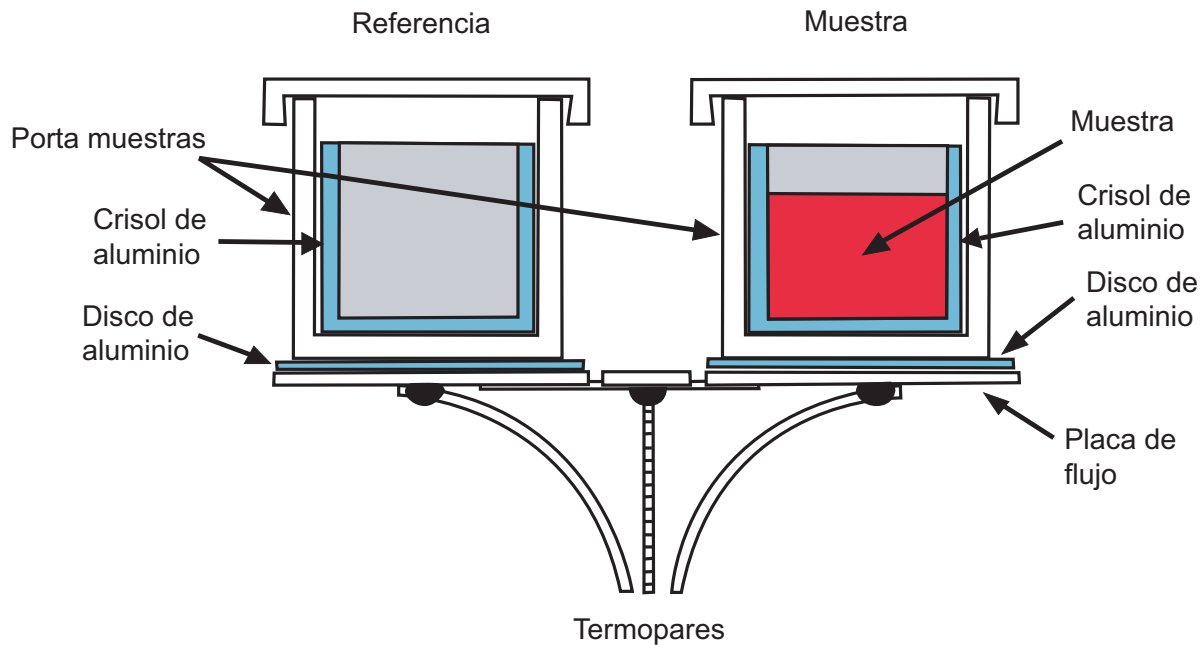


Figura 2.5: Esquema del calorímetro de barrido diferencial.

En uno de los crisoles se coloca la muestra a analizar, mientras que el otro crisol se queda vacío, sirviendo de referencia (figura 2.5). Entonces, durante el calentamiento de la muestra se mide el flujo de calor, manteniendo un equilibrio térmico entre la referencia y la muestra; esto se hace alterando la corriente que pasa a través de los calentadores de ambas cámaras. Por ejemplo, la referencia y una muestra se calientan con una rapidez determinada hasta que la muestra empieza a consumir o emitir calor. Si se trata de un proceso endotérmico, la temperatura de la muestra será menor que la de referencia.

Los circuitos eléctricos del equipo están programados para proporcionar temperatura constante para los compartimentos de la muestra y de la referencia. Se suministra por lo tanto una corriente adicional al compartimento de la muestra para elevar la temperatura hasta la de referencia. Se registra la corriente necesaria para mantener la temperatura constante entre la muestra y la referencia. Al término de la corrida se tiene una gráfica denominada termograma, donde aparecen varios picos que reflejan las transiciones ocurridas durante el experimento y donde el área bajo la curva resultante es una medida directa del calor de transición. La orientación de los picos indica si el proceso fue endotérmico o exotérmico, en este sentido, los valles (picos hacia abajo) denotan procesos endotérmicos y por el contrario las crestas (picos hacia arriba) indican que los procesos fueron exotérmicos.

A continuación se presenta una tabla con los posibles procesos que generan algún pico entálpico.

Tabla 2.2: Tabla de los posibles procesos térmicos y el tipo de señal que presentan

Proceso	Exotérmico	Endotérmico	Proceso	Exotérmico	Endotérmico
Transición sólido-sólido	✓	✓	Desolvatación (secado)		✓
Cristalización	✓		Descomposición	✓	✓
Fusión		✓	Reacción sólido-sólido	✓	✓
Vaporización		✓	Reacción sólido-líquido	✓	✓
Sublimación		✓	Reacción sólido-gas	✓	✓
Adsorción	✓		Polimerización	✓	
Desorción		✓	Reacciones catalíticas	✓	

Entre las variables que se pueden determinar a partir de esta técnica están las siguientes: temperatura de fusión, temperatura de ebullición, temperatura de cristalización, calor específico, pureza de la muestra, temperatura de transición vítrea, capacidad calorífica y entalpía de fusión.

Una vez concluida la mezcla de las soluciones precursoras, se tomó una alícuota de la solución resultante para caracterizarla por DSC, con el objeto de observar los cambios que sufre la solución respecto al incremento de la temperatura de la muestra, en particular se busca encontrar la temperatura de cristalización del material.

2.6.2. Difracción de rayos X (XRD)

La Difracción de Rayos X (XRD) es una herramienta útil en la caracterización de materiales cristalinos. Esta técnica aporta un panorama general sobre la composición de materiales cristalinos, ya que permite corroborar la presencia de la fase o compuesto deseado, si existe mezcla de fases, si se tiene la presencia de diferentes compuestos en el material, además de ayudarnos a determinar las estructuras presentes, siempre y cuando se estén estudiando materiales con estructuras de tipo cristalino. Es por esto que se considera un método primario en la caracterización de materiales cristalinos. Toda sustancia cristalina difracta los rayos X produciendo un patrón de difracción único, que constituye la huella de su estructura atómica y molecular. La intensidad y la posición de las reflexiones brindan la información básica requerida en el análisis de la estructura del cristal. La posición tiene relación con los parámetros de red [31].

Los rayos X son las radiaciones de longitud de onda corta que se atribuyen a cambios reversibles en la energía de los sistemas atómicos y se manifiestan en forma de energía radiante. Se originan en el salto de un electrón de una órbita a otra en el interior del átomo. Para producirlos eficientemente, se disparan electrones de alta velocidad (la velocidad de la luz) sobre un trozo de “material pesado” (figura 2.6). Los electrones invo-

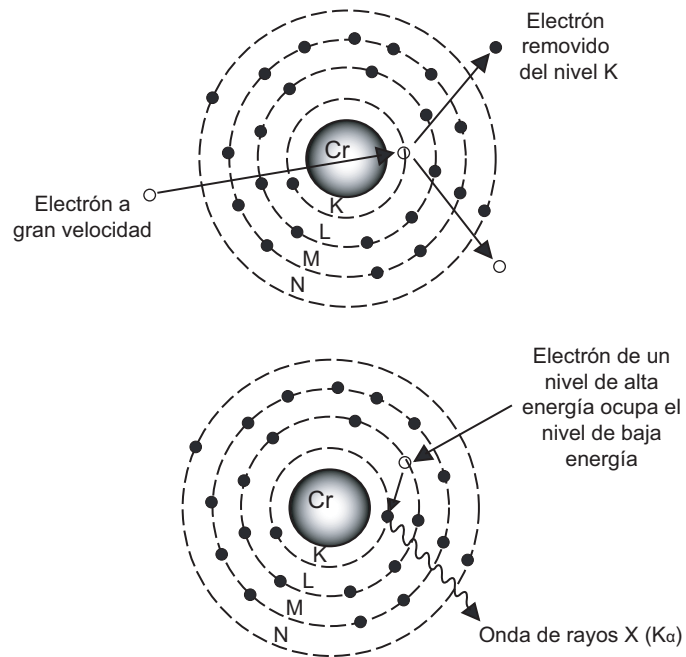


Figura 2.6: Generación de rayos X.

lucrados en la emisión de rayos X, son aquellos que se encuentran en los niveles más profundos de energía. Así se establece una serie bien definida de rayos X para cada tipo de átomo. Para clasificar las frecuencias convenientemente, se considera que los átomos consisten en una serie de capas de electrones que rodean al núcleo, a la capa más cercana al núcleo se le denomina capa K, a la siguiente capa L, etc. La designación K, L, M, N, O, P, etc. de las diferentes capas de electrones se hizo con la espectroscopia de rayos X y es idéntica a los números cuánticos $n = 1, 2, 3, 4, 5, 6$, etc. Cuando falta un electrón de la capa más profunda K, salta al lugar vacío un electrón cercano de la siguiente capa, emitiendo simultáneamente un fotón. Estos rayos X que desprenden millones de átomos producen el efecto descrito antes. Ya que la capa L ahora tiene un electrón menos, por lo tanto, puede saltar un electrón M al hueco de la capa L, con la consecuente emisión de otro rayo X, pero de diferente frecuencia. Esta serie de saltos continúa hasta que se llega a la capa exterior, por lo que un solo átomo puede emitir rayos X de diferentes longitudes de onda [31].

Para observar la difracción de los rayos X por un cristal, se requiere que la longitud de la onda incidente sea del orden de la distancia interplanar de la red cristalina. Los rayos X son radiaciones cuya longitud de onda oscila entre 0.2 y 100 Å. No todos los electrones pierden toda su energía en una colisión; algunos están menos acelerados y puede obtenerse una distribución de energías en el espectro continuo de rayos X con frecuencias mucho más pequeñas para un valor dado de potencial acelerado V . Así, una propiedad importante y útil de los rayos X es su capacidad para penetrar la materia sólida.

Cuando se obtiene el difractograma de un material, tenemos dos formas de interpretar los resultados. La

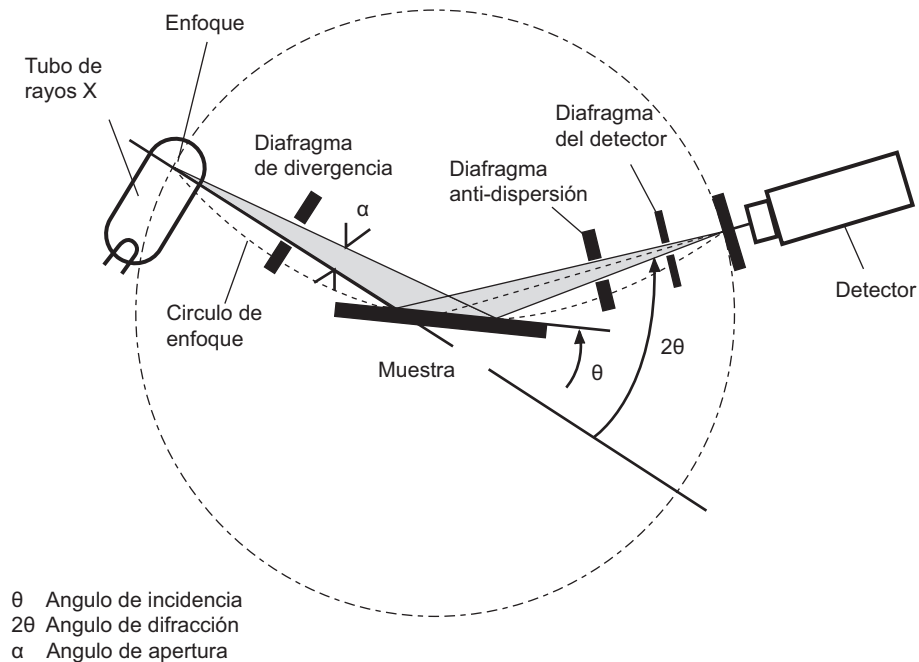


Figura 2.7: Esquema del difractor.

primera consiste en determinar los parámetros de celda, el sistema cristalino y el grupo espacial; a partir de esta información se pueden asignar los índices de Miller al patrón de difracción. A este proceso se le conoce como indexación. Otra manera de identificar las fases cristalinas mostradas en el difractograma (que es la que se usó en este trabajo), es comparando los difractogramas experimentales con los patrones de difracción registrados en las diferentes bases de datos que se tienen (CSD, ICSD, CDD, etc.).

Ley de Bragg

Cuando la radiación incide en un cristal (figura 2.7), choca con los átomos de la red cristalina y es dispersada en todas direcciones, volviendo así a cada átomo en un emisor de radiación de la misma frecuencia. En la figura 2.8 podemos observar dos rayos que inciden sobre la estructura cristalina paralelamente (con el mismo ángulo de incidencia). El átomo que se encuentra en P dispersa el primer rayo X , y el segundo viaja hasta el segundo plano de la red y es dispersado por el átomo que se encuentra en Q , por lo que la diferencia de camino óptico entre los dos rayos son los segmentos SQ y QT .

Dado este diagrama, la condición que se debe de cumplir para que la interferencia sea constructiva, es que la diferencia de camino óptico sea tal que las ondas dispersadas de los dos rayos lleguen en fase al detector, de manera que $SQ + QT$ debe ser igual a un número entero de longitudes de onda de la radiación incidente y podemos escribir esta distancia en términos de θ , ya que cada uno de estos segmentos es igual a $d \sin \theta$.

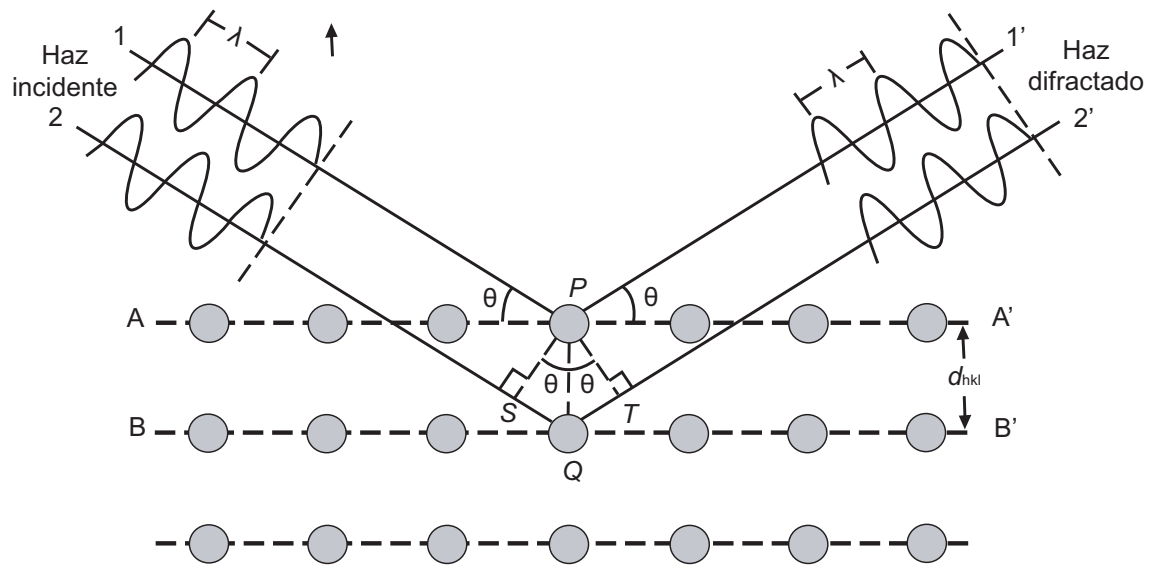


Figura 2.8: Difracción de rayos x por los planos atómicos AA' y BB'.

Lo anterior está expresado por la ley de Bragg, que es:

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (2.1)$$

donde d es la distancia entre los planos, θ el ángulo incidente, n un número entero (1, 2, 3, 4, 5, etc.) y λ la longitud de onda de la radiación incidente.

De esta manera conociendo θ y λ , es posible deducir la distancia interplanar del cristal. Los equipos modernos de XRD, usan la radiación $K\alpha$ del cobre para los análisis que se llevan a cabo rutinariamente, y puesto que las distancias interplanares determinadas para cada uno de los picos del difractograma son características de cada cristal, es posible identificar las fases cristalinas presentes en la muestra.

Las muestras fueron pulverizadas para caracterizarlas por difracción de rayos X, con el objeto de tener cristales orientados en todas las direcciones posibles, lo que provoca que la probabilidad de incidencia de los rayos X sea igual para cada uno de los planos cristalinos presentes en cada una de las fases que componen la muestra.

2.6.3. Microscopia electrónica (TEM y SEM)

La microscopía es un conjunto de técnicas y métodos destinados a hacer visibles los objetos de estudio que por su pequeñez están fuera del rango de resolución del ojo humano. Si bien el microscopio es el elemento central de la microscopía, el uso del mismo requiere de todo un conjunto de métodos y técnicas afines al aparato para producir las imágenes adecuadas [32]. Algunas de ellas son técnicas de preparación y manejo de los objetos de estudio, o bien, técnicas de salida, procesamiento, interpretación y registro de imágenes. La microscopía en general, implica la difracción, reflexión o refracción de algún tipo de radiación incidente en el objeto de estudio.

Un microscopio electrónico es el que utiliza electrones en lugar de fotones o luz visible para formar imágenes de objetos diminutos. Los microscopios electrónicos permiten alcanzar una capacidad de aumento muy superior a los microscopios convencionales debido a que la longitud de onda de los electrones es mucho menor que la de los fotones visibles.

Un microscopio electrónico funciona con un haz de electrones generados por un cañón electrónico, acelerados por un alto voltaje y focalizados por medio de lentes magnéticas, todo esto al alto vacío, ya que los electrones pueden ser absorbidos por el aire. Los electrones atraviesan la muestra (figura 2.9) y la amplificación se produce mediante un conjunto de lentes magnéticas que forman una imagen sobre una placa fotográfica o sobre una pantalla sensible al impacto de los electrones. Los microscopios electrónicos sólo se pueden formar imágenes en blanco y negro, puesto que no utilizan la luz.

En primer lugar, discutiremos el microscopio electrónico de transmisión convencional TEM (por sus siglas en inglés Transmission Electron Microscope), en el que los electrones pasan a través de una muestra delgada (≤ 200 nm), como la luz en un microscopio óptico, y forman una imagen de la sección atravesada. Cuando la energía de los electrones es igual o mayor que 500 keV suele denominarse microscopio electrónico de alto voltaje (HVEM). En segundo lugar, está el microscopio electrónico de barrido SEM (por sus siglas en inglés Scanning Electron Microscope); aquí los electrones se focalizan sobre la superficie de una muestra masiva. El haz electrónico incidente barre la superficie de la muestra, y los electrones reflejados y/o retrodispersados por la superficie producen una señal que se lleva a un tubo de rayos catódicos [31]. En este tubo, la señal barre la pantalla de manera sincronizada con el movimiento del haz electrónico sobre la muestra formando una imagen de la superficie. El TEM transmite los electrones sin realizar un barrido; el SEM ejecuta un barrido pero no transmite los electrones.

A continuación trataremos a detalle cada una de estas técnicas de microscopia por separado para conocer sus particularidades y las ventajas que presenta una técnica respecto a la otra.

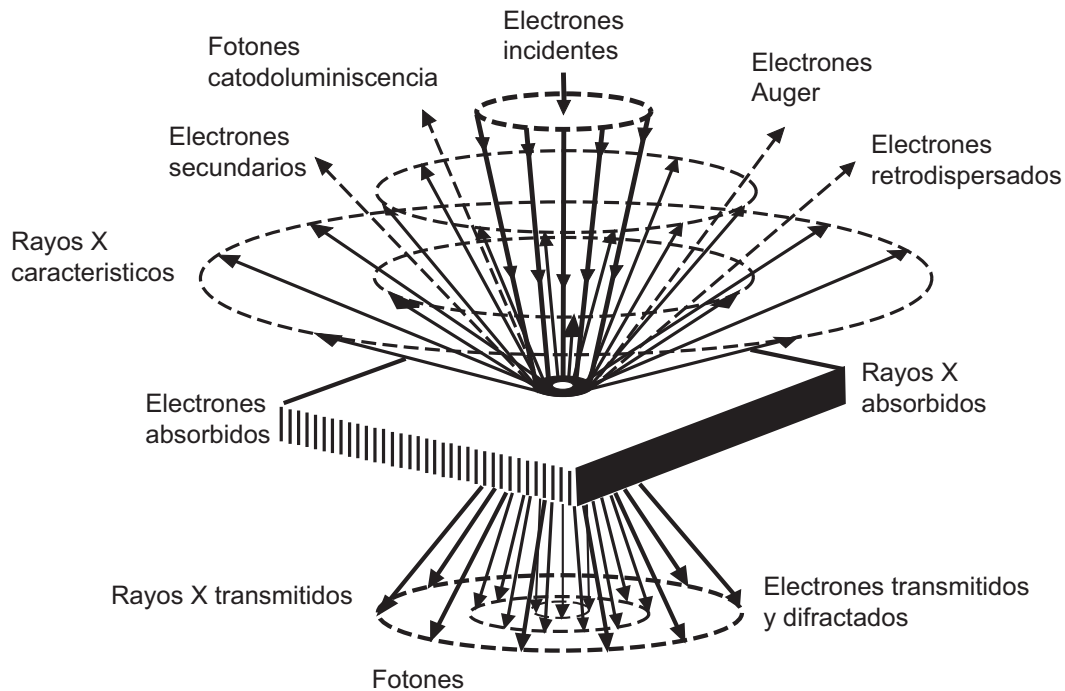


Figura 2.9: Señales emitidas por el haz de electrones al chocar con la muestra.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) representa la extensión natural del microscopio óptico compuesto, hace uso del carácter ondulatorio de los electrones, junto con la posibilidad de refractarlos utilizando lentes magnéticas adecuadas; estableciéndose un paralelismo entre la óptica luminosa y la óptica electrónica. Además, la técnica de difracción de electrones, permitía realizar estudios cristalográficos a una escala igual o mayor que $1\mu m$. En las dos últimas décadas, distintas técnicas de análisis se han incorporado a este microscopio aumentando extraordinariamente sus posibilidades.

Un microscopio electrónico de transmisión consta de los mismos elementos que un microscopio óptico; de acuerdo con su función pueden agruparse en cinco componentes (ver figura 2.10): 1) el sistema de iluminación, formado por el cañón de electrones y dos lentes condensadoras, suministra los electrones que “iluminarán” la muestra; 2) el portamuestras; 3) la lente objetivo, constituye el corazón de cualquier microscopio y proporciona una primera imagen de la muestra con un aumento comprendido entre $\times 50$ y $\times 100$; 4) el sistema de aumento, constituido por tres o cuatro lentes, a menudo denominadas lente de difracción, lente intermedia y lentes proyectoras, facilita la imagen final de la muestra; y 5) el sistema de visualización de la imagen.

El sistema de lentes condensadoras permite variar la intensidad de la iluminación, esto es, la densidad de corriente del haz en el plano de la muestra, para adaptarla al tipo de ésta y al aumento final requerido. La muestra,

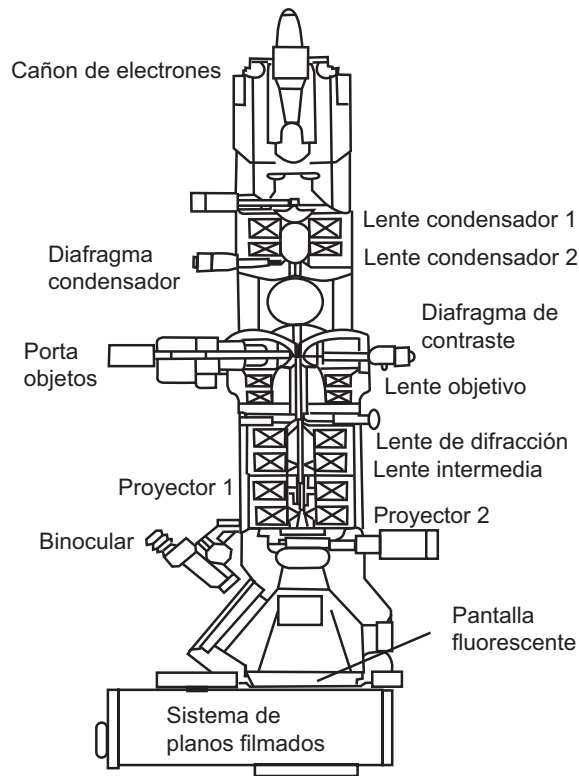


Figura 2.10: Esquema de los componentes de un TEM.

que en todos los casos tiene que ser transparente a los electrones, debe tener un espesor máximo que depende del tipo de interacción electrón-muestra utilizado para formar la imagen y del modo de operación, por lo que su espesor puede oscilar entre 10 y 500 nm. La distancia focal de la muestra varía entre 1 y 5 mm. En general, cuanto más corta es la distancia focal, menores son las aberraciones y mayor el poder de resolución. El aumento total puede variar entre aproximadamente $\times 50$ y $\times 10^6$. Excepto por los valores más bajos, los distintos aumentos se obtienen variando la intensidad de la corriente en las dos lentes proyectoras.

La imagen se hace visible cuando los electrones inciden sobre una pantalla fluorescente con un tamaño de grano del fósforo de unos $100\mu\text{m}$. La pantalla se puede observar a través de unos binoculares que suministran un aumento adicional de $\times 10$. Otra alternativa, es registrar la imagen en una placa o película fotográfica sensible a los electrones situada debajo de la pantalla fluorescente. En los modernos microscopios, se utiliza también con frecuencia un monitor de televisión para registrar la imagen.

Para poder observarlas muestras de hidroxiapatita en el microscopio de transmisión, éstas se pulverizaron y se depositaron en una rejilla de cobre con recubrimientos de Formvar y carbón.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido constituye una de las técnicas más utilizadas en el análisis de superficies debido a que provee una imagen de gran amplificación y definición de la muestra en estudio.

El equipo de microscopía electrónica de barrido consiste en una columna que alberga un filamento (una fuente de electrones), objetivo o lente electromagnética y unas bobinas de exploración, como se muestra en la figura 2.11. En la base de la columna está la cámara que contiene los detectores y la plataforma donde se deposita la muestra.

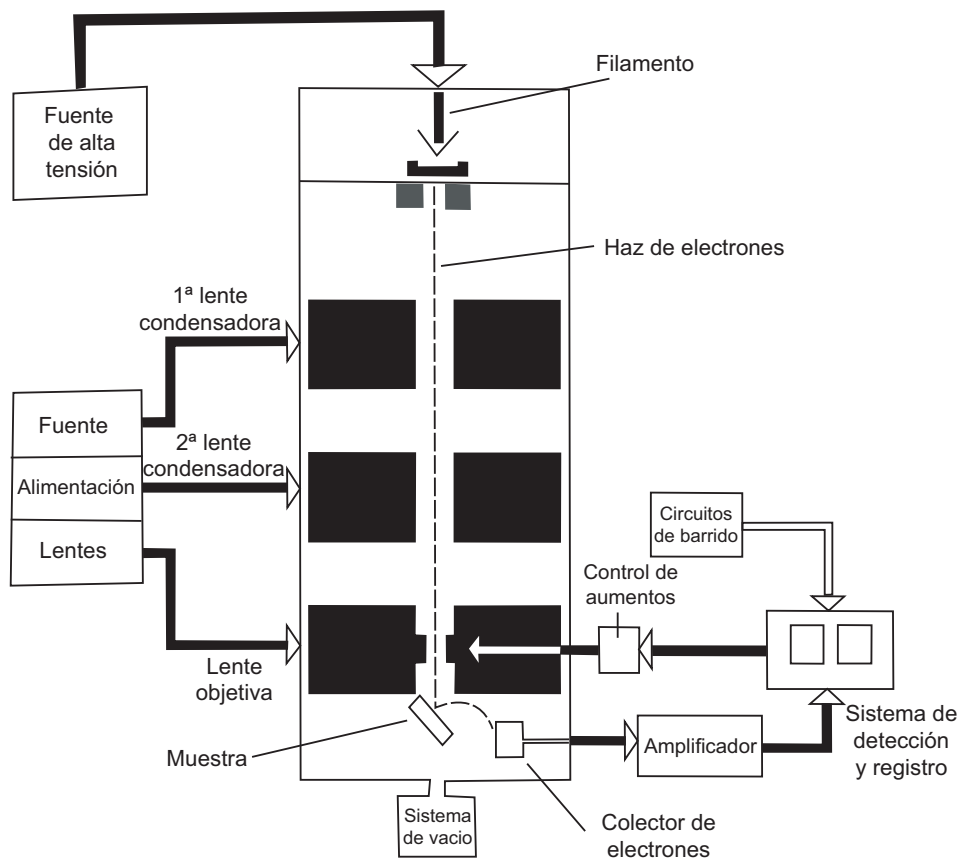


Figura 2.11: Esquema de los componentes básicos de un microscopio electrónico de barrido (SEM).

Dependiendo del objetivo particular del estudio, se puede operar el equipo en diferentes maneras, por ejemplo bajo voltaje, superficie sensible, alta resolución.

En la microscopía electrónica de barrido (SEM) los electrones emitidos por un cañón de electrones (electrones primarios) se centran por medio de lentes electromagnéticas sobre la superficie de la muestra, que escanean punto por punto a la muestra. De esta forma se adquieren datos de la muestra de un punto en un momento. En

cada lugar donde un haz de electrones primarios impacta en la muestra, un flujo de electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos X y otros tipos de señales son emitidas de la muestra (figura 2.9). Los electrones secundarios y los electrones retrodispersados emitidos por la muestra son capturados por detectores y presentados en forma de modulaciones de brillo en un monitor. Los electrones secundarios provienen de una capa superficial de hasta 10 nm de espesor, mientras que los electrones retrodispersados se originan en capas más profundas.

Una porción de cada señal emitida viaja en tal dirección que entra en el detector, el cual mide la intensidad de los electrones emitidos en cada punto de la muestra y convierte este valor de intensidad en una escala de grises. Entonces, se despliegan valores digitalizados en un monitor y la imagen que se obtiene en el monitor está sincronizada con el movimiento y la posición del haz de electrones sobre la muestra. Este proceso se aplica a todas las señales colectadas simultáneamente, permitiendo la formación de una imagen muy ampliada de la superficie de la muestra. En los nuevos equipos de SEM, todos los controles (filamento, voltaje, foco, amplificación, plataforma de control, etc.) se operan mediante una computadora y una palanca de control.

En el pasado, las muestras que se observaban por SEM debían ser conductoras, para evitar que se cargaran o se calentaran cuando fueran irradiadas por el haz de electrones. Si las muestras no eran conductoras (como la hidroxiapatita y otros materiales cerámicos y poliméricos), había que recubrirlas con una película metálica (oro, oro-paladio, cromo o carbón) con el fin de evitar dichos inconvenientes y mejorar la calidad de las imágenes obtenidas. Estos recubrimientos eran imperceptibles a escalas micrométricas, pero a menores escalas provocaban cierta incertidumbre en la imagen observada, ya que no se sabía si lo que se estaba observando era el material de estudio o el recubrimiento metálico. En la actualidad, los microscopios SEM cuentan con mejores instrumentos de descarga para las muestras, lo que permite observar materiales cerámicos a escalas nanométricas sin necesidad de usar recubrimientos conductores.

Capítulo 3

Metodología experimental

En este trabajo se sintetizaron y caracterizaron cristales de hidroxiapatita por el método propuesto por D. Meza y colaboradores [33], utilizando nitrato de calcio tetrahidratado ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) y pentóxido de fósforo (P_2O_5) como precursores, con una relación atómica de Ca/P=1.67 para la obtención de hidroxiapatita estequiométrica.

3.1. Objetivo general

Estudiar la variación del tamaño de los cristales de hidroxiapatita con respecto a las temperaturas de mezclado y de calcinación, en la síntesis de polvos mediante el método de sol-gel.

3.1.1. Metas

- Observar el cambio en la microestructura del material
- Encontrar las condiciones ideales para la síntesis de nanocristales de hidroxiapatita
- Obtener un material potencialmente biocompatible para su posterior aplicación en el área biomédica, principalmente para el recubrimiento de prótesis metálicas

3.2. Materiales

En la tabla 3.1 se muestra la descripción de los reactivos que se utilizaron en la síntesis de las muestras:

Debido a su toxicidad, se debe ser cuidadoso con el manejo de los reactivos, en particular con el pentóxido de fósforo, ya que es el material más tóxico, es corrosivo, higroscópico y puede causar desde la irritación del

Tabla 3.1: Tabla de seguridad de los reactivos utilizados

Reactivo	Formula	Proveedor	Pureza	R i e s g o s			
				Inhalación	Piel	Ojos	Ingestión
Pentóxido de fósforo	P_2O_5	Merck	98 %	Quemazón en nariz y garganta, tos, jadeo, edema pulmonar.	Enrojecimiento, quemaduras cutáneas, dolor.	Enrojecimiento, dolor, quemaduras profundas graves.	Dolor abdominal, diarrea, náusea, vómitos.
Nitrato de calcio tetrahidratado	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	Tecsiqim	99 %	Irritaciones en el tracto respiratorio.	Irritaciones, posible absorción por la piel, nocivo.	Irritaciones.	Nocivo de baja toxicidad, náuseas, vómitos, irritación gastrointestinal.
Etolanol	CH_3CH_2OH	JT Baker	99.61 %	Alta concentración de vapor causa somnolencia, tos, irritación de ojos y tracto respiratorio, dolor de cabeza.	Resequedad.	Irritación, enrojecimiento, dolor, sensación de quemadura.	Actúa como estimulante seguido de depresión, dolor de cabeza, visión borrosa, somnolencia e inconsciencia.

órgano en contacto hasta un edema pulmonar, si es que se inhala. Es importante usar bata, guantes y goggles para el manejo de estas sustancias.

3.3. Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental que consta de tres variables experimentales, a dos de ellas se le asignaron tres valores y a la última solo dos valores, como se muestra en la tabla 3.2:

Tabla 3.2: Diseño experimental

Variabes	Valores asignados
Temperatura de la mezcla de precursores	2 °C (1), 25 °C (2), 44 °C (3)
Temperatura de calcinación	600 °C (A), 900 °C (B), 1200 °C (C)
Tiempo de calcinación	2 hrs (2), 4hrs (4)

3.4. Metodología de síntesis

Este método se divide en cinco etapas: preparación de las soluciones precursoras, mezclado de las mismas, secado de la mezcla resultante, la calcinación de las muestras obtenidas y por último, el lavado de los polvos

resultantes.

3.4.1. Preparación de soluciones

Primero se prepararon las dos soluciones precursoras en vasos de precipitados por separado, en uno de ellos se disolvieron 4.26 g de pentóxido de fósforo en 88 mL de etanol (solución 0.4 M) y en el otro se disolvieron 23.6 g de nitrato de calcio tetrahidratado en 292 mL de etanol (solución 0.35 M), dejándolas en agitación magnética vigorosa a temperatura ambiente hasta que cada una de ellas se observe homogénea y sin partículas suspendidas (este proceso toma alrededor de 5 minutos).

A continuación se presenta la reacción propuesta para este proceso:



3.4.2. Mezclado de precursores

Lo siguiente fue preparar la mezcla de precursores. Para ello, se mantuvo la disolución de nitrato de calcio (precursor de Ca) en agitación magnética y se le agregó por goteo la disolución de pentóxido de fósforo (precursor de P) a temperatura ambiente y a una tasa de 10 mL/min (fig. 3.1). Después del goteo resultó una solución blanquizca, traslúcida y homogénea. Se prepararon nueve soluciones bajo estas condiciones, manteniendo la agitación magnética durante la hora posterior al goteo en cada una, pero cambiando la temperatura de mezclado de las mismas. De tal forma que se obtuvieron 3 soluciones con agitación posterior al goteo a 2 °C, 3 soluciones con agitación posterior al goteo a 25 °C y tres soluciones con agitación posterior al goteo a 44 °C. Todo esto con la finalidad de observar la dependencia de la reacción con la temperatura.

Con lo anterior se obtuvieron nueve soluciones, a las cuales se les asignó un número del 1 al 3, dependiendo de la temperatura a la que se mezclaron, siendo HA1 las soluciones con el mezclado a 2 °C, HA2 las soluciones con el mezclado a 25 °C y HA3 las soluciones con el mezclado a 44 °C. Al finalizar esta etapa se obtuvo una alícuota de cada solución para su caracterización por calorimetría diferencial de barrido.

3.4.3. Secado de las muestras

Una vez concluido el mezclado, se colocaron las soluciones resultantes a secar en una campana de extracción durante 20 horas, manteniendo la agitación magnética e incrementando la temperatura de la mezcla a 56 °C, con el fin de evaporar el alcohol de la solución y obtener un material como el que se muestra en la fig 3.2.



Figura 3.1: Mezclado por goteo del precursor de P en el precursor de Ca.

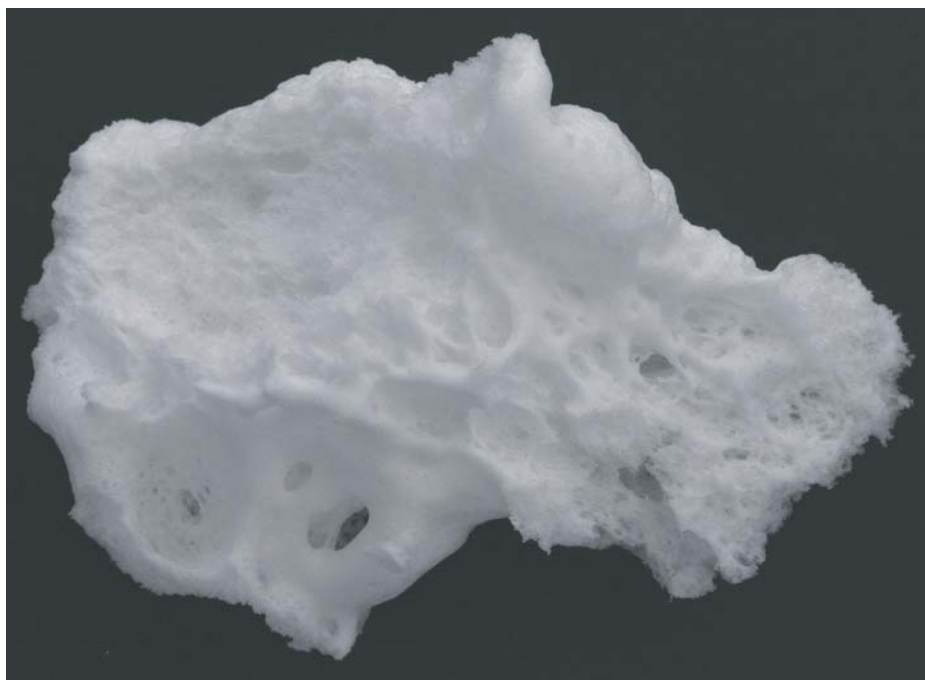


Figura 3.2: Muestra de fosfato de calcio obtenida al finalizar el secado.



Figura 3.3: Muestra de hidroxiapatita obtenida al finalizar el calcinado.

3.4.4. Calcinación de la hidroxiapatita

Al finalizar el secado, se obtuvieron espumas color blanco con alta porosidad y amorfas que necesitan de un tratamiento térmico para promover la formación de los cristales de hidroxiapatita (fig. 3.3) . Estas espumas fueron calcinadas dos horas a 600 °C, 900 °C y 1200 °C según se muestra en la fig. 3.4.

Después de la calcinación, se pulverizó cada una de las muestras en el mortero hasta obtener polvos adecuados para su posterior caracterización. A los polvos obtenidos se les asignó una letra de la A a la C según la temperatura a la que fueron calcinados, donde A denota que la calcinación se hizo a 600 °C, B denota la calcinación hecha a 900 °C y C denota la calcinación hecha a 1200 °C. Además, se agregó un cuatro al final de la nomenclatura si el tiempo de calcinación fue de cuatro horas.

3.4.5. Lavado de los polvos

Después de las primeras pruebas de caracterización, se observó en los difractogramas de los polvos que éstos presentaban cierta cantidad de óxido de calcio, que se eliminó con tres lavados y filtrados de las muestras con agua destilada. Como resultado del lavado, las muestras se obtuvieron en forma de pasta, por lo que se pusieron a secar 30 min en un horno a 120°C con la única finalidad de evaporar el exceso de agua y obtener las muestras pulverizadas de nueva cuenta. Dichas muestras se caracterizaron con difracción de rayos X y con la microscopía electrónica de barrido, para observar el efecto del lavado a los polvos.

3.5. Diagrama de flujo

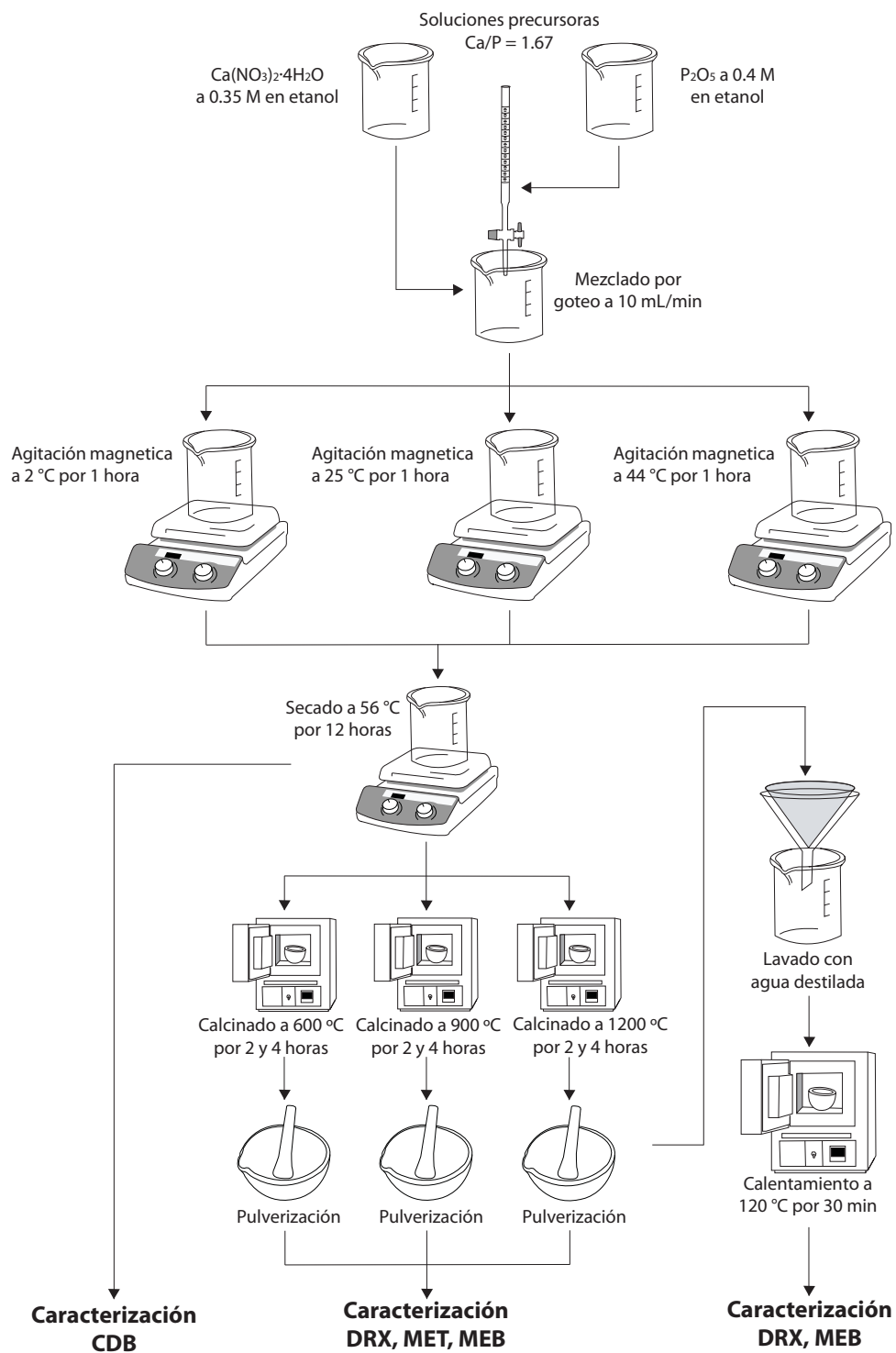


Figura 3.4: Diagrama de flujo.

Capítulo 4

Resultados, su análisis y su discusión

4.1. Calorimetría diferencial de barrido

La prueba de calorimetría diferencial de barrido se llevó a cabo en un equipo de análisis térmico simultáneo SDT Q600 de la marca TA Instruments, en atmósfera controlada de nitrógeno y en un intervalo de temperaturas de 25°C a 1000°C, con una rapidez de calentamiento de 10°C/min. Se utilizaron portamuestras de alúmina. A continuación se presentan los termogramas obtenidos.

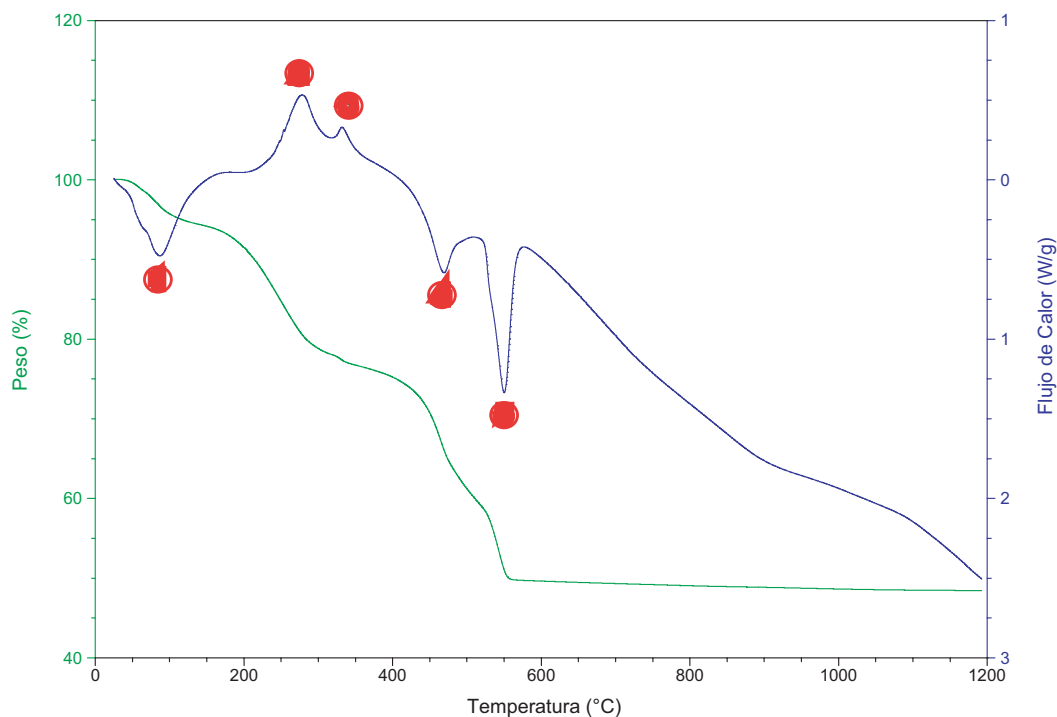


Figura 4.1: Termograma de la muestra HA10, con temperatura de mezclado a 2 °C y sin calcinación.

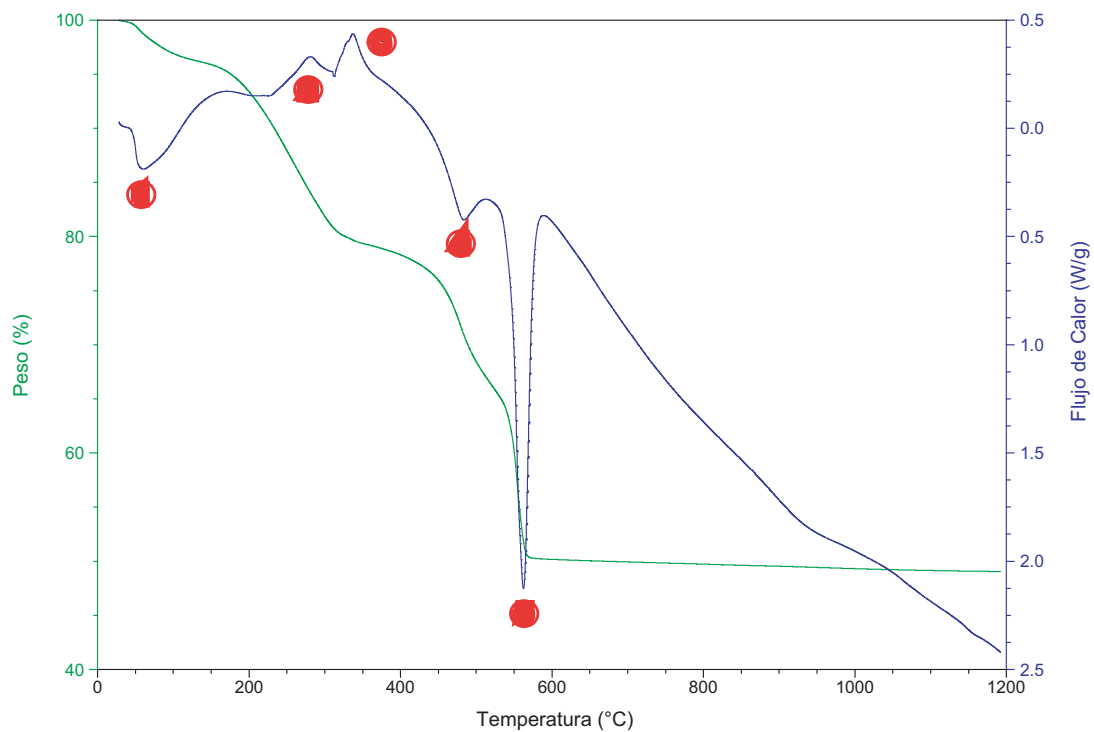


Figura 4.2: Termograma de la muestra HA20, con temperatura de mezclado a 25 °C y sin calcinación.

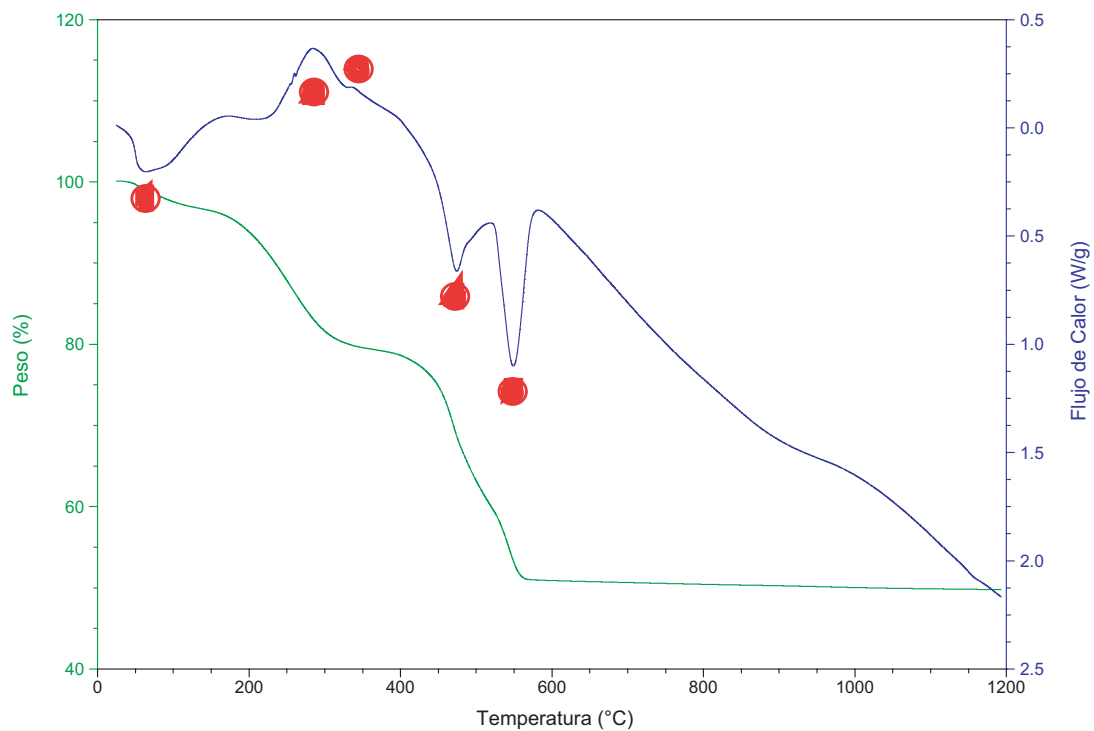


Figura 4.3: Termograma de la muestra HA30, con temperatura de mezclado a 44 °C y sin calcinación.

Las figuras 4.1- 4.3 muestran los termogramas obtenidos a partir del calentamiento de la mezcla resultante de los precursores a diferentes temperaturas. Se pueden apreciar 5 picos presentes para cada termograma obtenido. A continuación se discutirá cada uno de los picos resultantes.

El primero es un pico endotérmico y se presenta a una temperatura muy baja, por lo que podemos proponer que se debe a la evaporación del alcohol presente en las muestras. Esta es una evaporación superficial, ya que hasta este punto sólo se ha evaporado el alcohol que no está atrapado en la estructura del fosfato de calcio.

Los picos 2 y 3 son exotérmicos, por lo que están asociados a procesos de liberación del exceso de energía con la finalidad de proporcionarle estabilidad al sistema. Estos picos pueden estar asociados al comienzo de la cristalización de material (nucleación), la cual se lleva a cabo a una temperatura cercana a los 250°C. A partir de este momento podemos comenzar a llamar al producto hidroxiapatita, ya que lo que se tenía previamente era un fosfato de calcio amorfo.

Finalmente, los picos 4 y 5 son de tipo endotérmico y están asociados a una gran pérdida de masa. Por lo anterior podemos establecer que son picos que se encuentran relacionados con la pérdida del solvente que se encontraba atrapado en los huecos más pequeños de la estructura de la hidroxiapatita, puesto que fue más complicado (se requirió de una mayor cantidad de energía) evaporarlo. Este proceso concluye a una temperatura aproximada de 550°C, por lo que los tratamientos térmicos los debemos hacer por arriba de esta temperatura.

Para obtener la entalpia de cristalización del material, se utilizó el programa TA Universal Analysis, el cual calcula el área bajo la curva del termograma en la región de interés y nos proporciona el punto donde comienza el proceso térmico. De esta manera se obtuvieron los siguientes valores de entalpias de cristalización para cada muestra:

Tabla 4.1: Entalpias de cristalización

Muestra	Entalpia de cristalización [J/g]
HA10	86.37
HA20	24.84
HA30	77.33

4.2. Difracción de rayos X

Los patrones de difracción de rayos X de los polvos estudiados se obtuvieron en un difractómetro Bruker-D8 Advance con radiación $CuK\alpha$ ($\lambda = 1.554 \text{ \AA}$). Las mediciones se realizaron en el intervalo angular de 20° a 80° en 2θ (que es el intervalo en el que se encuentran los picos característicos de la hidroxiapatita) con un paso angular de 0.016° y un tiempo de conteo de 0.3 segundos en cada paso. Cada muestra se giró a una velocidad angular de 15 rpm.

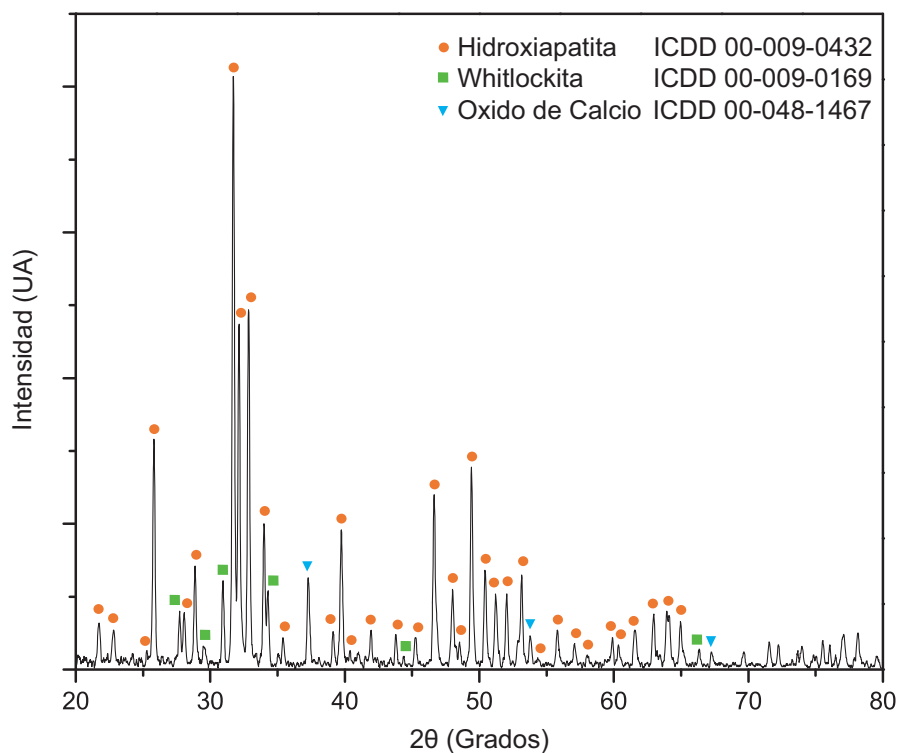


Figura 4.4: Difractograma de rayos x de la muestra HA1A, con temperaturas de mezclado a 2°C y de calcinación a 600°C .

De acuerdo con los patrones de difracción obtenidos de las muestra podemos observar que en efecto, el tratamiento térmico es importante para el crecimiento de los cristales. Las muestras calcinadas a 600°C (HA1A, HA2A y HA3A) presentan bajo grado de cristalinidad ya que en dichos patrones despliegan el comportamiento característico de los materiales amorfos. El grado de cristalinidad de las muestras depende de la temperatura de calcinación de las mismas y del tiempo que dure el proceso. En los patrones de difracción podemos observar la presencia de la Whitlockita, que es un mineral presente en los huesos, es un tipo de fosfato de calcio que se ha descubierto que promueve la regeneración de los mismos [34], es totalmente biocompatible. Otro material encontrado es el Oxido de Calcio, un material que provoca irritación en los tejidos, y si es detectado por el difractómetro (2%), significa que se encuentra en la proporción suficiente para causar algún tipo de toxicidad. Sin embargo, las muestras HA2A y HA1B no presentan esta fase, además están calcinadas a diferentes tempera-

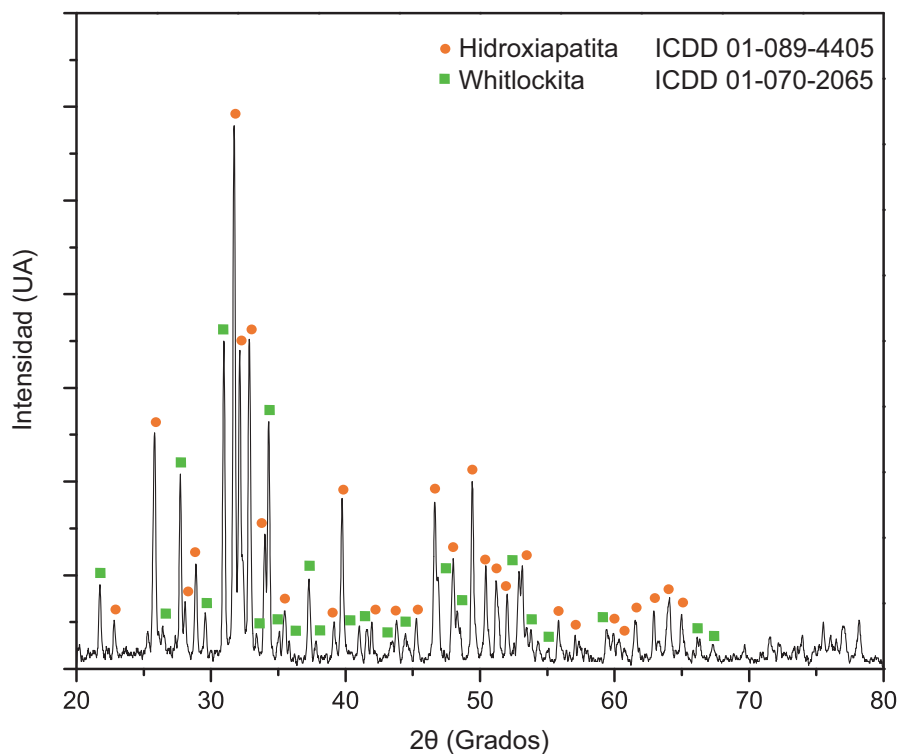


Figura 4.5: Difractograma de rayos x de la muestra HA1B, con temperaturas de mezclado a 2 °C y de calcinación a 900 °C.

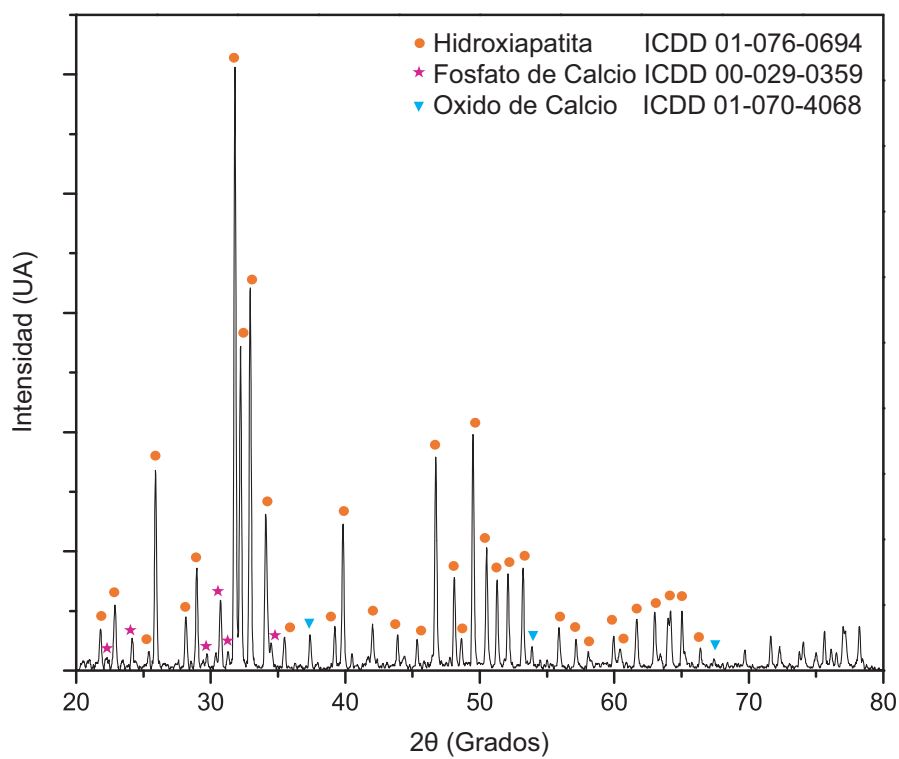


Figura 4.6: Difractograma de rayos x de la muestra HA1C, con temperaturas de mezclado a 2 °C y de calcinación a 1200 °C.

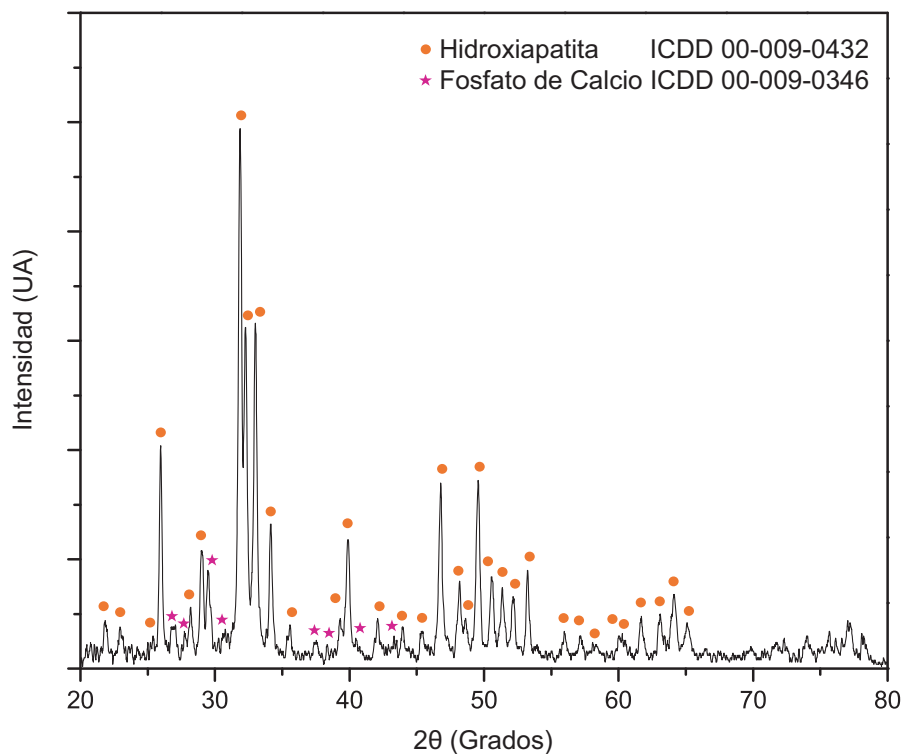


Figura 4.7: Difractograma de rayos x de la muestra HA2A, con temperaturas de mezclado a 25 °C y de calcinación a 600 °C.

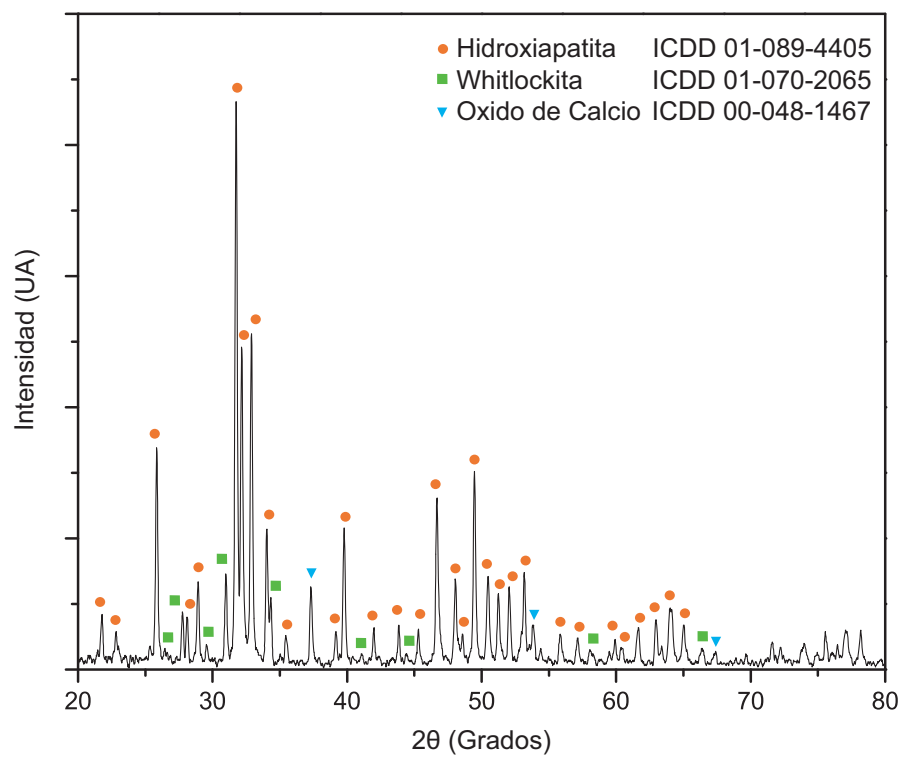


Figura 4.8: Difractograma de rayos x de la muestra HA2B, con temperaturas de mezclado a 25 °C y de calcinación a 900 °C.

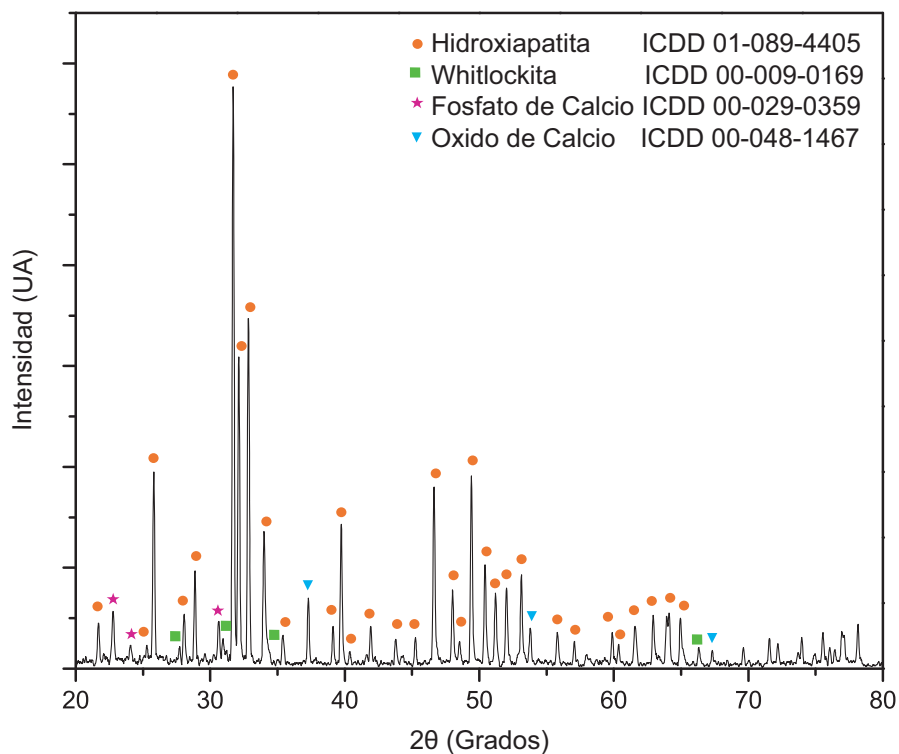


Figura 4.9: Difractograma de rayos x de la muestra HA2C, con temperaturas de mezclado a 25 °C y de calcinación a 1200 °C.

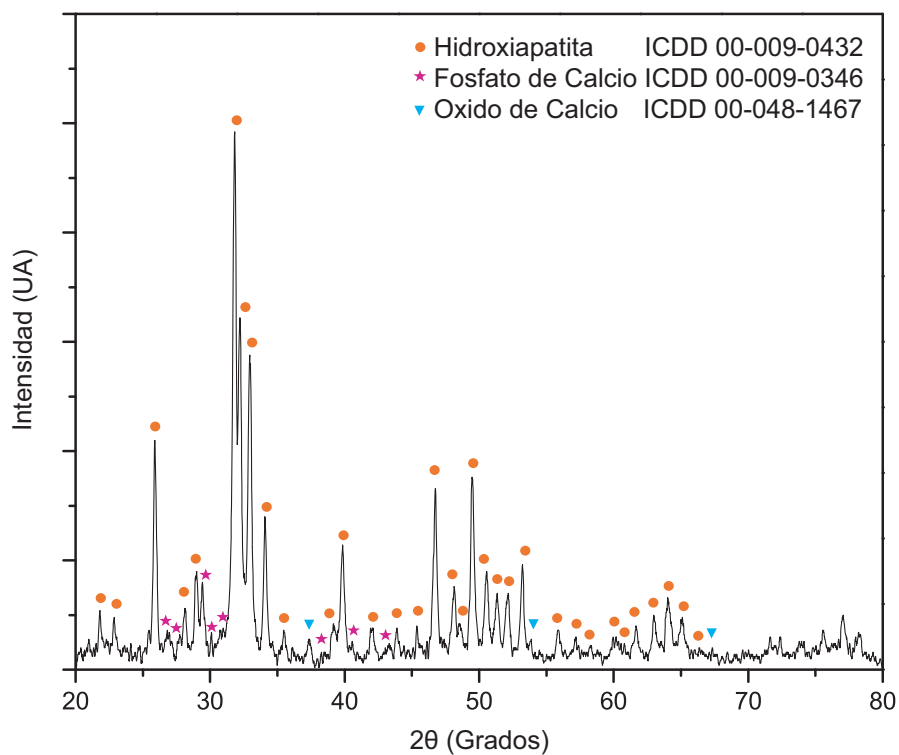


Figura 4.10: Difractograma de rayos x de la muestra HA3A, con temperaturas de mezclado a 44 °C y de calcinación a 600 °C.

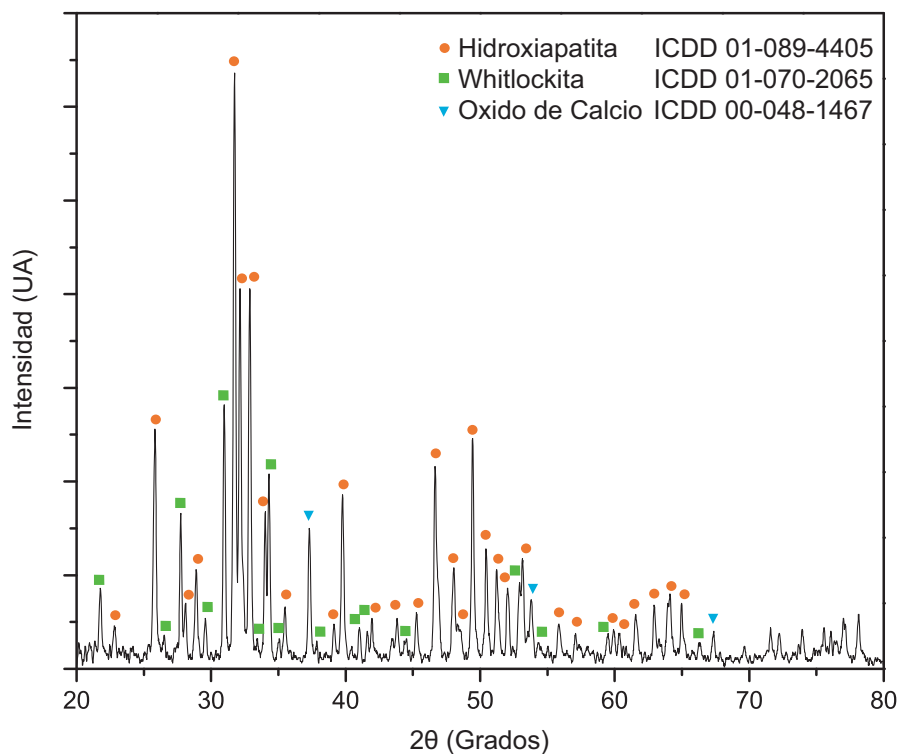


Figura 4.11: Difractograma de rayos x de la muestra HA3B, con temperaturas de mezclado a 44 °C y de calcinación a 900 °C.

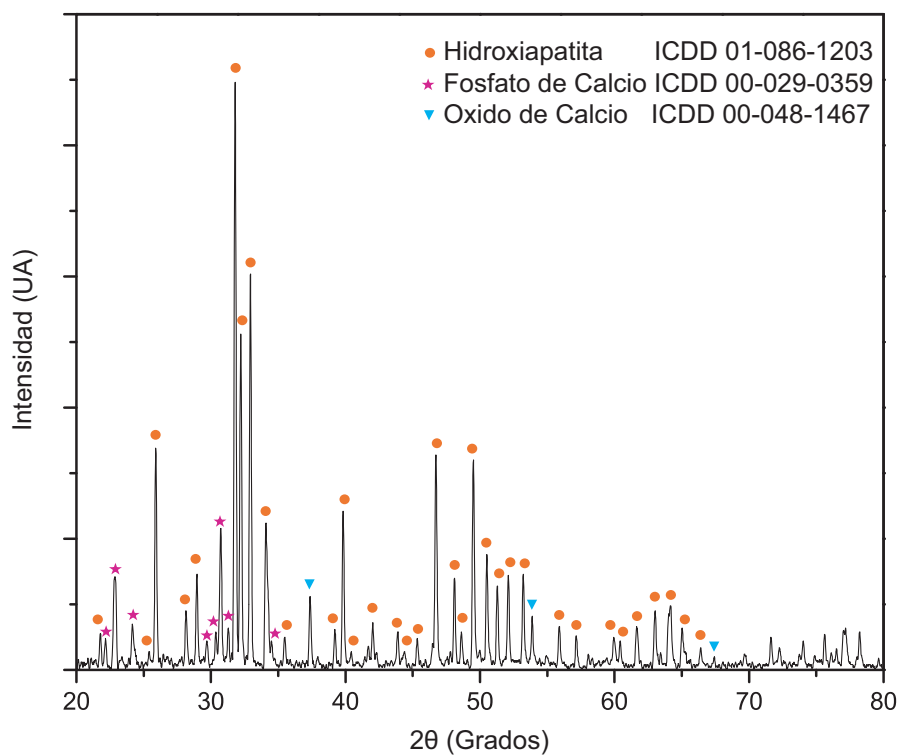


Figura 4.12: Difractograma de rayos x de la muestra HA3C, con temperaturas de mezclado a 44 °C y de calcinación a 1200 °C.

turas y su temperatura de mezclado es diferente, lo que nos indica que las temperaturas, tanto de calcinación como de mezclado, juegan un papel importante en la cinética de la reacción, formando subproductos que pueden o no ser adecuados.

Para calcular los parámetros red de cada una de las muestras obtenidas y tomando en cuenta que la hidroxiapatita forma una estructura hexagonal, utilizaremos la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{4}{3} \left[\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right] + \frac{l^2}{c^2} \quad (4.1)$$

donde d_{hkl} es la distancia interplanar en la dirección hkl , que a su vez, éstos son los índices de Miller de la dirección cristalográfica dada y a y c son los parámetros de la celda hexagonal. En la tabla 4.2 se muestran los parámetros de red calculados para cada muestra, obtenidos a partir de las distancias interplanares en las direcciones (0 0 2) y (3 0 0), que se calcularon con la ecuación 2.1.

Para el cálculo del tamaño de los cristales se utilizó la fórmula de Scherrer (formula 4.2) y tomando como referencia los picos ubicados en $2\theta \approx 49.5^\circ$, debido a que son los picos singuletes de HA con mayor intensidad.

$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (4.2)$$

donde τ es el tamaño promedio de los cristales, K es la constante de forma cuyo valor comúnmente es de 0.94, λ es la longitud de onda de los rayos incidentes (el equipo utilizado trabaja con $\lambda = 1.55 \text{ \AA}$), θ es el ángulo en el que se presenta el pico que se utiliza en la medición y β es el factor de Anantharaman y Chirstian (medido en radianes) que se calcula con la ecuación:

$$\beta = \frac{B^2 - b^2}{B} \quad (4.3)$$

donde B es el ancho del pico experimental medido en radianes a la altura media y b es el ancho medio del pico de referencia también medido en radianes, el cual no muestra efecto de tamaño de cristal y se debe a un error instrumental. Este parámetro depende del difractómetro que se utilice y para este trabajo se calculó a partir de boruro de lantano (LaB_6), obteniendo un valor de $b=0.09^\circ$ ($b=0.001571 \text{ rad}$).

En la tabla 4.2 se muestran los tamaños de cristales obtenidos usando la formula de Scherrer para cada una de las muestras y tomando como referencia los picos ubicados en $2\theta \approx 49.5^\circ$. Los valores de β se calcularon a partir de la ecuación 4.3.

Tabla 4.2: Parámetros de red y tamaño de cristales calculados para cada muestra.

Muestra	$d_{211}[nm]$	$d_{300}[nm]$	$a = b[nm]$	$c[nm]$	$B[rad]$	$\theta[^\circ]$	$\tau[nm]$
HA1A	0.3528	0.2838	0.9831	0.7056	0.003316	49.421	74
HA1B	0.3532	0.2838	0.9831	0.7064	0.003246	49.425	77
HA1C	0.3513	0.2834	0.9817	0.7026	0.002827	49.501	98
HA2A	0.3507	0.2840	0.9838	0.7014	0.005270	49.552	40
HA2B	0.3535	0.2838	0.9831	0.7070	0.003246	49.467	77
HA2C	0.3537	0.2840	0.9838	0.7074	0.002722	49.415	105
HA3A	0.3482	0.2826	0.9790	0.6964	0.004537	49.502	48
HA3B	0.3510	0.2824	0.9783	0.7020	0.002967	49.444	89
HA3C	0.3531	0.2836	0.9824	0.7062	0.002652	49.509	111

Al comparar los parámetros de red obtenidos experimentalmente (ver tabla 4.2) con los que se reportan en la literatura ($a = b = 9.432 \text{ \AA}$ y $c = 6.88 \text{ \AA}$), podemos observar que los parámetros que se obtuvieron de manera experimental son un poco mayores a los teóricos (aunque la diferencia es muy pequeña), lo que se debe a algún tipo de sustitución en la estructura de la hidroxiapatita, que muy probablemente se encuentre en el plano (0 0 1), ya que los parámetros a y b se encuentran en este plano y son los que sufrieron mayor deformación.

En las figuras 4.13 y 4.14 se muestra la comparación de los patrones de difracción de las muestras que fueron sometidas al lavado con agua destilada. En estos difractogramas se puede observar que el lavado es útil para la eliminación del óxido de calcio de las muestras y que además, no promueve la formación de nuevas fases, dado que la diferencia entre cada par de patrones de difracción radica en la presencia o ausencia de los picos característicos del óxido de calcio.

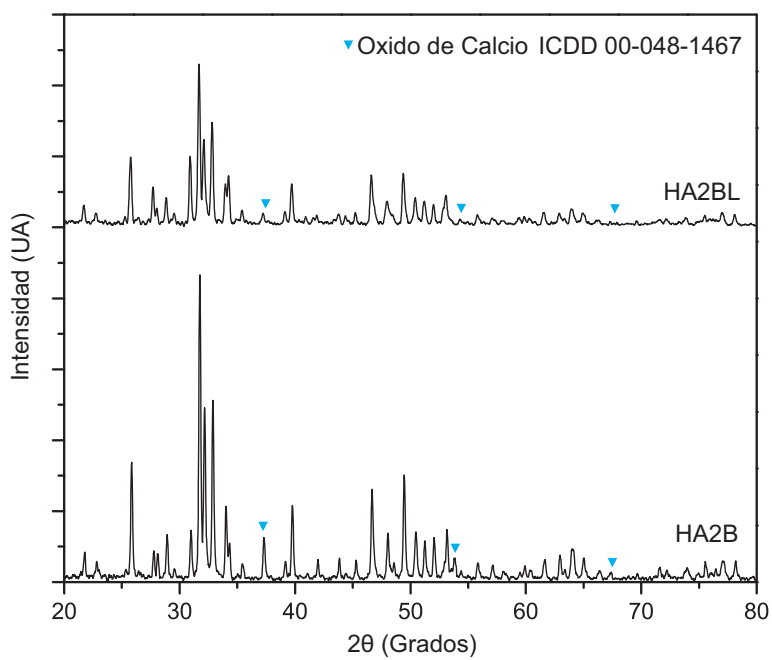


Figura 4.13: Comparación de difractogramas de las muestras HA2B y HA2BL (lavada con agua destilada).

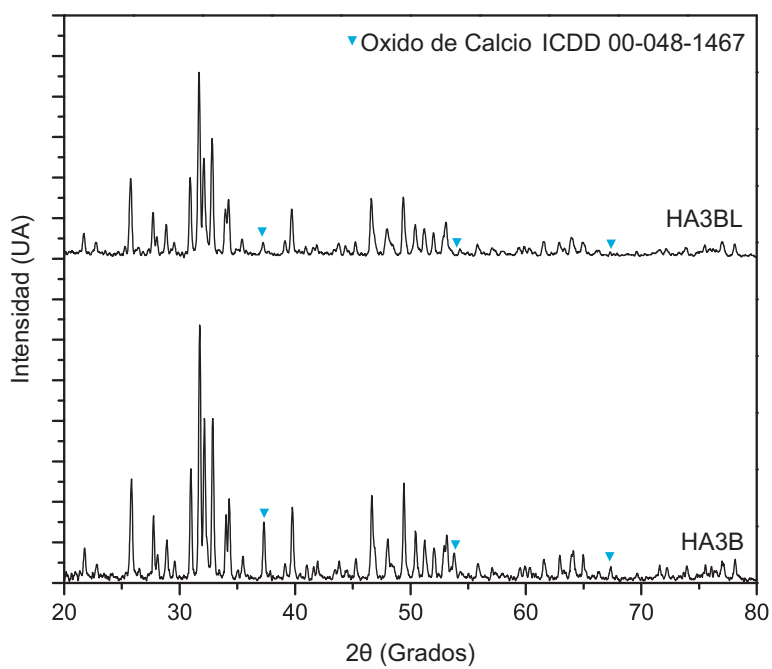


Figura 4.14: Comparación de difractogramas de las muestras HA3B y HA3BL (lavada con agua destilada).

4.3. Microscopia electrónica de transmisión

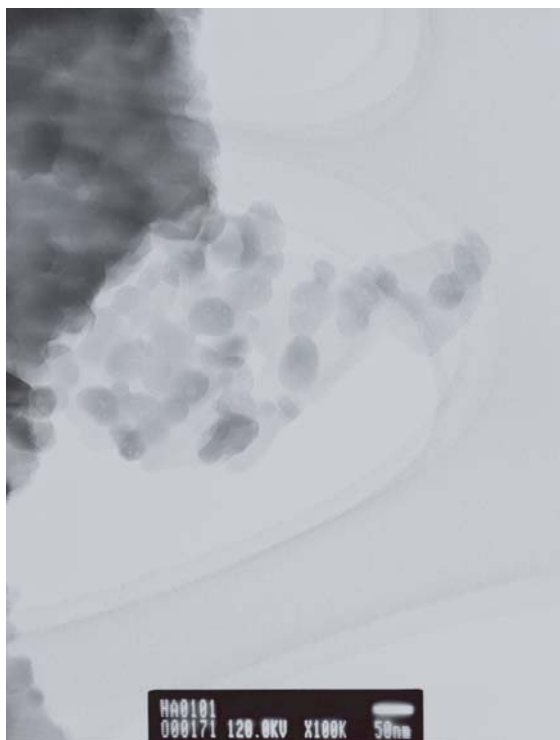
Las micrografías de transmisión de electrones fueron obtenidas con un microscopio marca JEOL modelo JEM-1200EX en campo claro y a 120 kV.

Las micrografías mostradas anteriormente muestran la tendencia del crecimiento de las partículas proporcionalmente con el cambio en la temperatura de calcinado. Además se puede verificar que la aproximación de Scherrer nos proporciona una idea muy cercana del tamaño de las partículas obtenidos con temperaturas de calcinación de 600 °C y 900 °C, cosa que no sucede con las muestras calcinadas a 1200 °C, ya que el cálculo nos predice tamaños de partícula menores a los 100 nm y en las micrografías se puede apreciar que dichos cristales tienen tamaño superior a esta cantidad, aunque la tendencia del incremento del tamaño de partícula con el incremento de la temperatura de calcinación se mantiene.

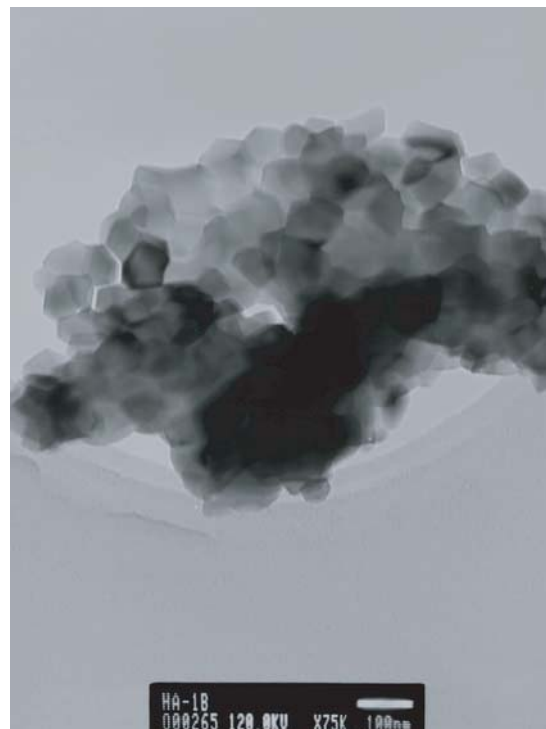
En cuanto a la morfología, en general, se presentan partículas uniformes en cuanto a tamaño y forma, aunque para las muestras calcinadas a 600 °C se pueden apreciar algunas zonas en las que éstas no están bien definidas, lo cual se puede deber al grado de cristalinidad que tienen los polvos bajo estas condiciones de tratamiento térmico (calcinación a 600 °C por dos horas).

En las figuras 4.15, 4.16 y 4.18 se observan partículas de aproximadamente 60 nm para el caso de la calcinación a 600 °C, de alrededor de 70 nm para las muestras que se calcinaron a 900 °C y de 1 μm para las que se calcinaron a 1200 °C. Estos valores son congruentes con los valores de tamaño promedio de los cristales calculados con la fórmula de Scherrer en la tabla 4.2, lo que nos indica que las partículas y los cristales son del mismo tamaño (partículas monocristalinas). En estas micrografías también se pueden observar que a medida que se aumenta la temperatura de calcinación de las muestras los cristales se ven más definidos y homogéneos en cuanto a tamaño y forma, para la misma temperatura de agitación de las muestras.

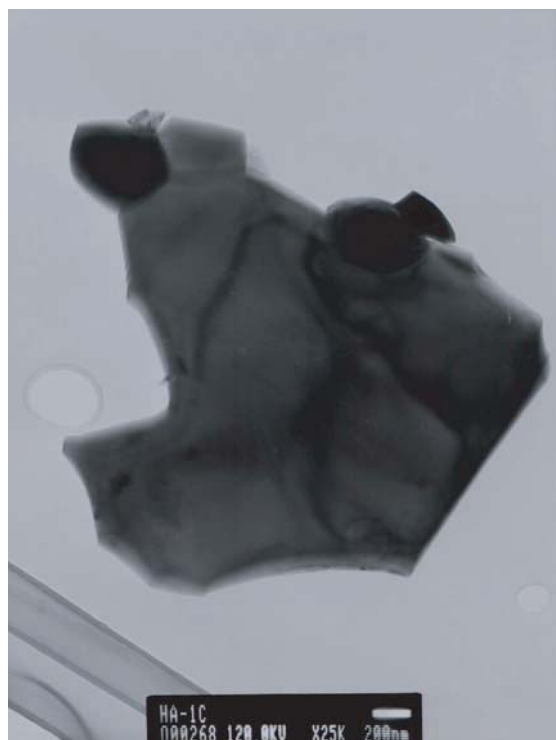
En la figura 4.17 se presentan los patrones de difracción de electrones obtenidos de las muestras HA2A, HA2B y HA2C. Estos patrones se obtuvieron con la única finalidad de corroborar que el tamaño de las partículas obtenidas sea de orden nanométrico. En las figuras 4.17a y 4.17b se pueden apreciar anillos concéntricos, lo que nos indica que las partículas obtenidas se encuentran dentro del tamaño deseado, debido a que este es un patrón de difracción característico de las partículas nanométricas, cosa que no sucede en la figura 4.17c, en la que podemos observar una dispersión de las señales registradas por el TEM y de la que podemos solo concluir que se trata de un material cristalino (debido al ordenamiento de los puntos), pero a la que tendríamos todavía que indexar para saber más detalles de la muestra.



(a) HA1A

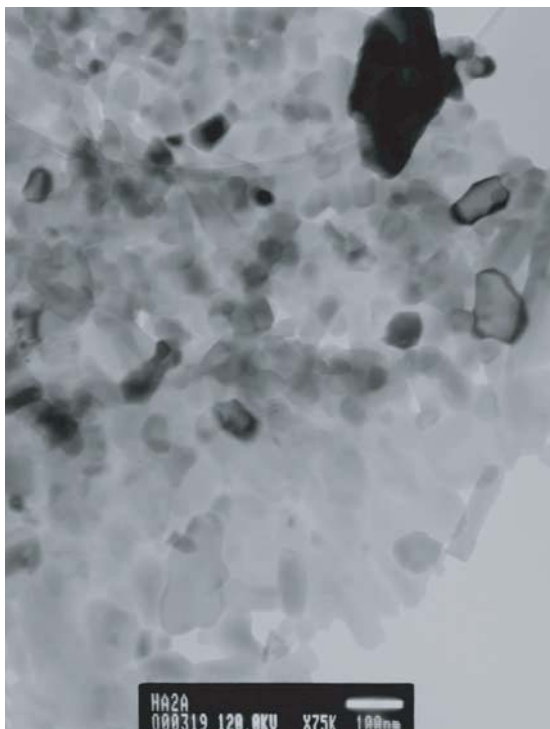


(b) HA1B

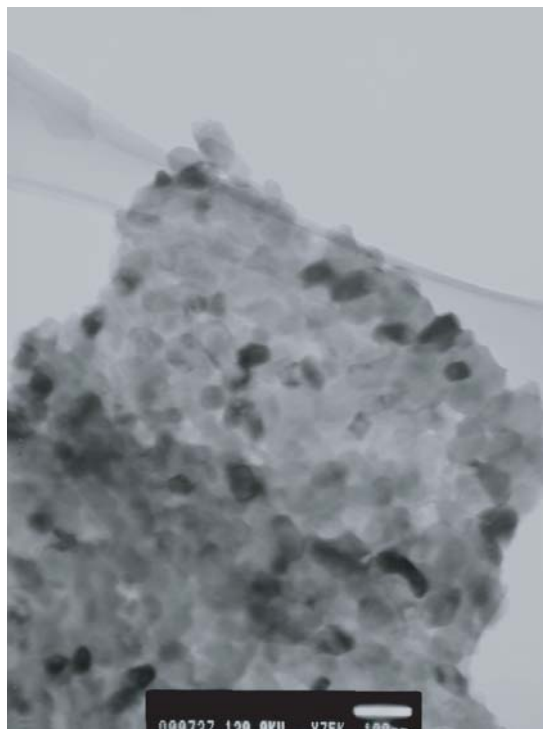


(c) HA1C

Figura 4.15: Micrografías de transmisión de las muestras con temperaturas de mezclado a 2 °C y temperatura de calcinación a) a 600 °C, b) a 900 °C y c) a 1200 °C



(a) HA2A



(b) HA2B



(c) HA2C

Figura 4.16: Micrografías de transmisión de las muestras con temperaturas de mezclado a 25 °C y temperatura de calcinación a) a 600 °C, b) a 900 °C y c) a 1200 °C

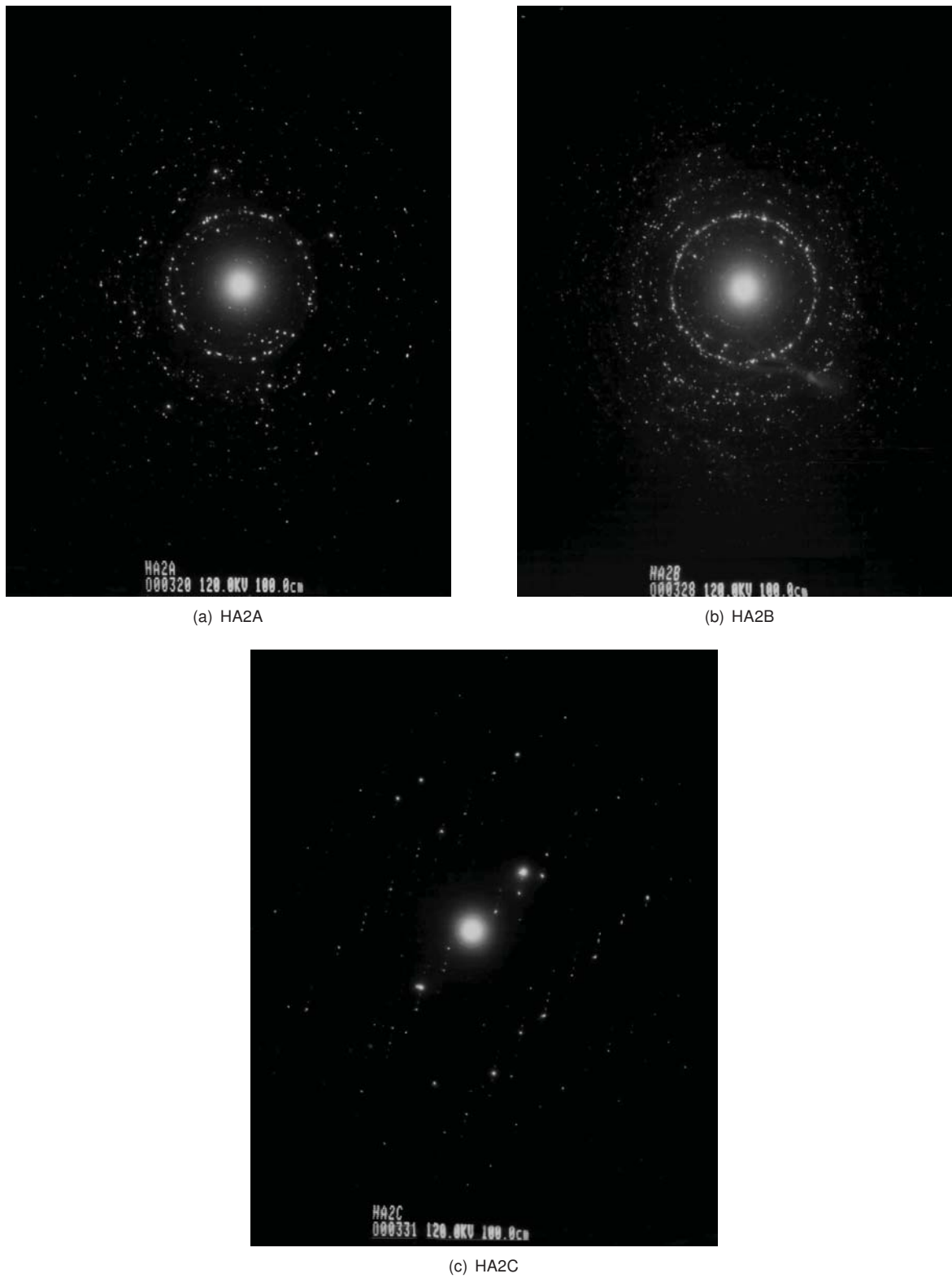
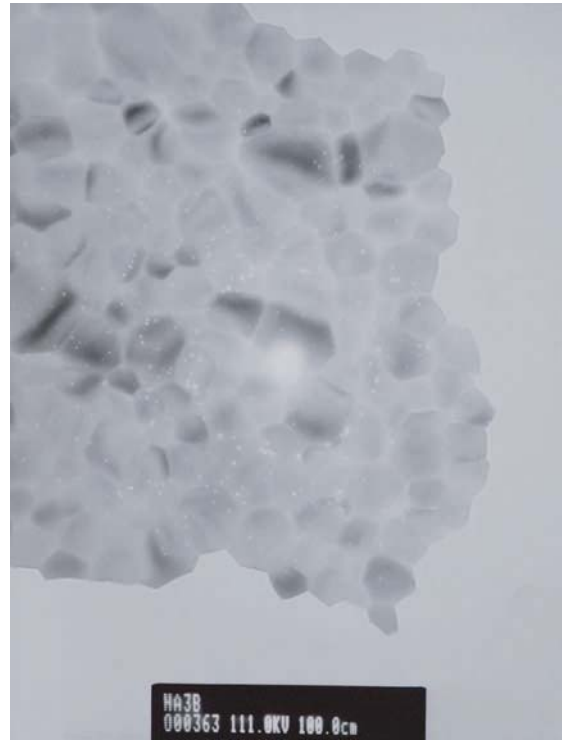


Figura 4.17: Patrones de difracción de electrones de las muestras con temperaturas de mezclado a 25 °C y temperatura de calcinación a) a 600 °C, b) a 900 °C y c) a 1200 °C



(a) HA3A



(b) HA3B



(c) HA3C

Figura 4.18: Micrografías de transmisión de las muestras con temperaturas de mezclado a 44 °C y temperatura de calcinación a) a 600 °C, b) a 900 °C y c) a 1200 °C

4.4. Microscopia electrónica de barrido

Las micrografías de barrido de electrones fueron obtenidas con un microscopio electrónico de emisión de campo marca JEOL, modelo JSM-7600F, con un detector de electrones secundarios SEI y con una diferencia de potencial de 2kV.

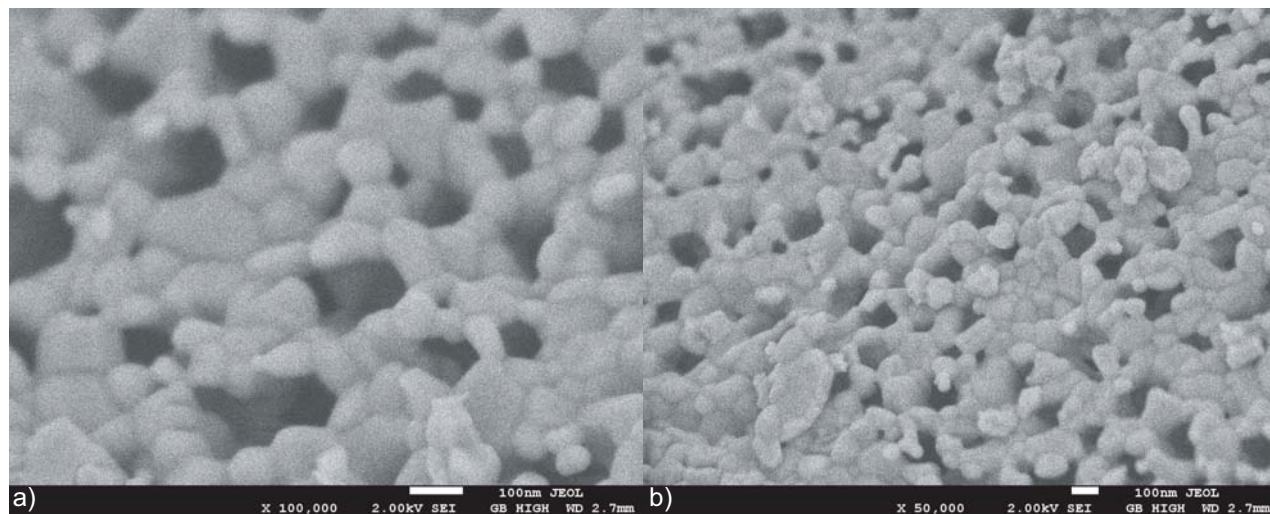


Figura 4.19: Micrografías de barrido de la muestra HA1A, con temperaturas de mezclado a 2 °C y de calcinación a 600 °C, a) a x100k y b) a x50k.

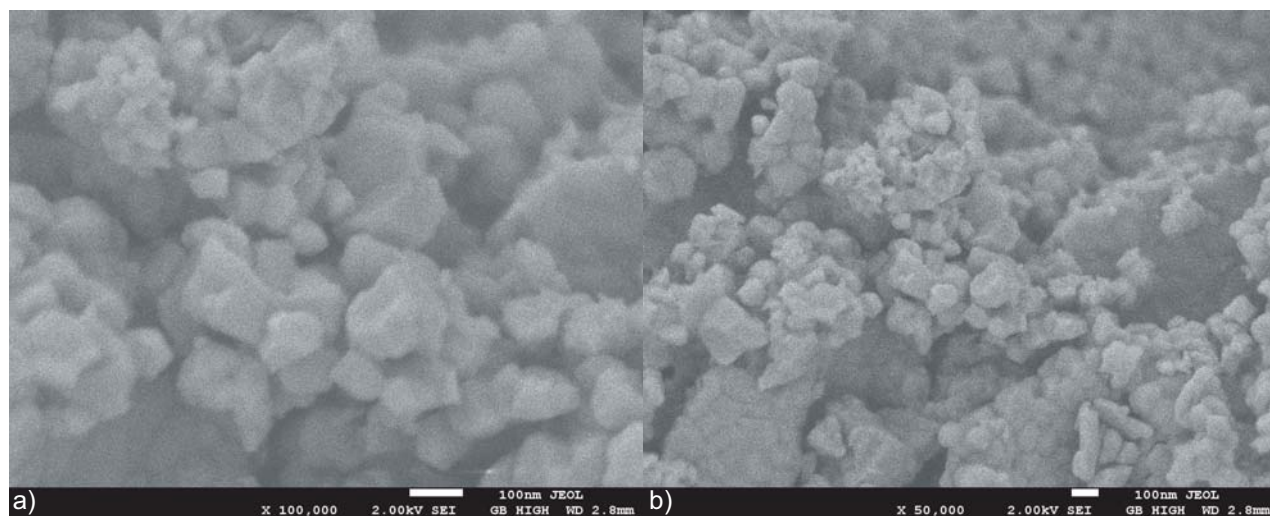


Figura 4.20: Micrografías de barrido de la muestra HA1B, con temperaturas de mezclado a 2 °C y de calcinación a 900 °C, a) a x100k y b) a x50k.

De las micrografías de SEM podemos corroborar que el tamaño promedio de las partículas presentes en los polvos, con temperaturas de calcinación por debajo de los 900 °C, se encuentra dentro del rango nanométrico.

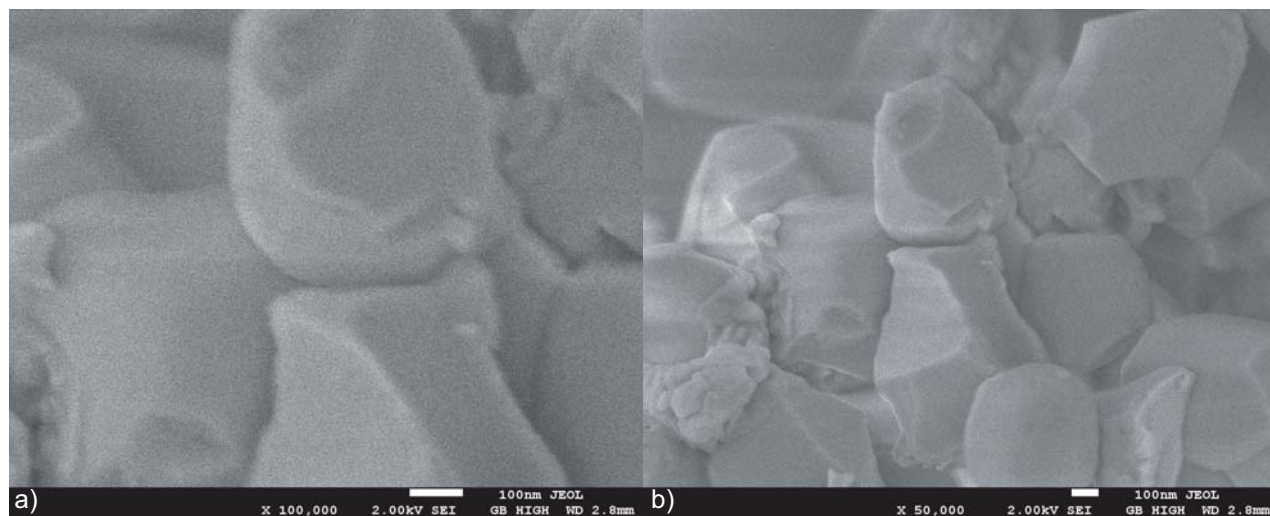


Figura 4.21: Micrografías barrido de la muestra HA1C, con temperaturas de mezclado a 2 °C y de calcinación a 1200 °C, a) a x100k y b) a x50k.

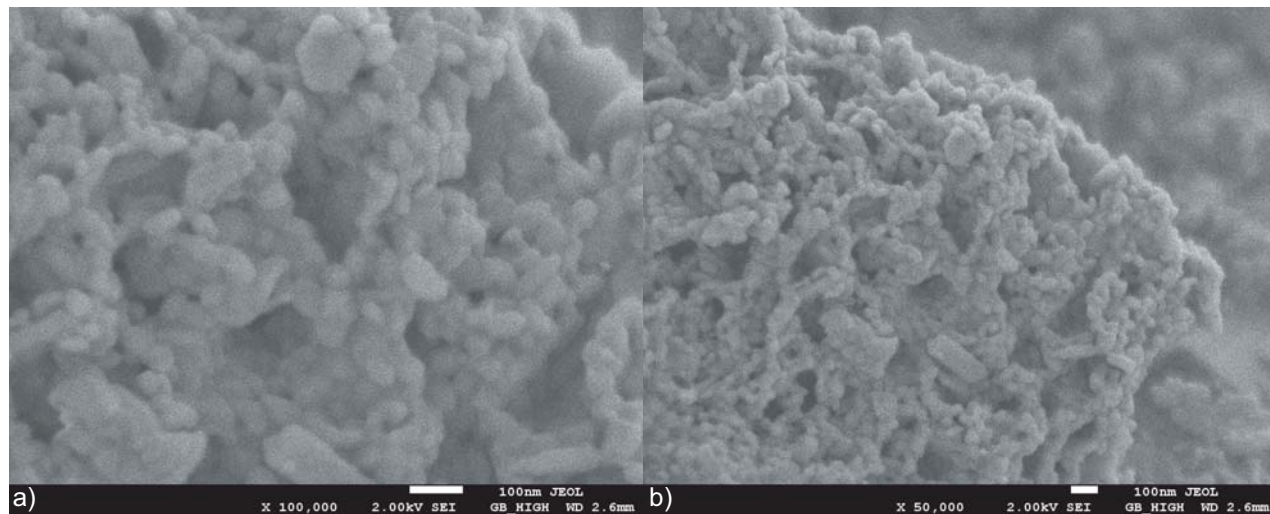


Figura 4.22: Micrografías de barrido de la muestra HA2A, con temperaturas de mezclado a 25 °C y de calcinación a 600 °C, a) a x100k y b) a x50k.

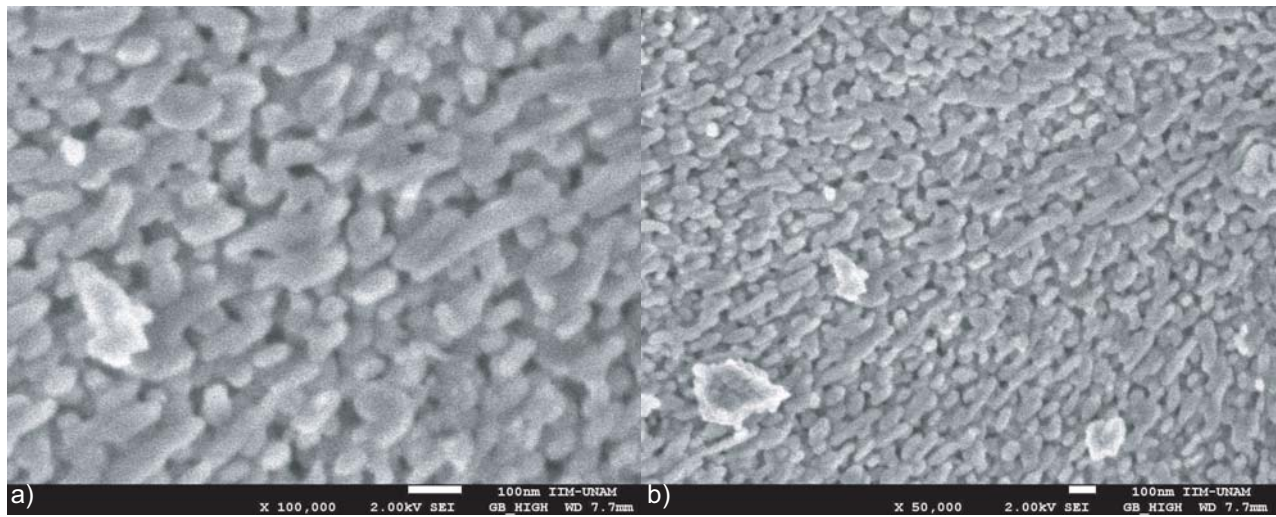


Figura 4.23: Micrografías de barrido de la muestra HA2B, con temperaturas de mezclado a 25 °C y de calcinación a 900 °C, a) a x100k y b) a x50k.

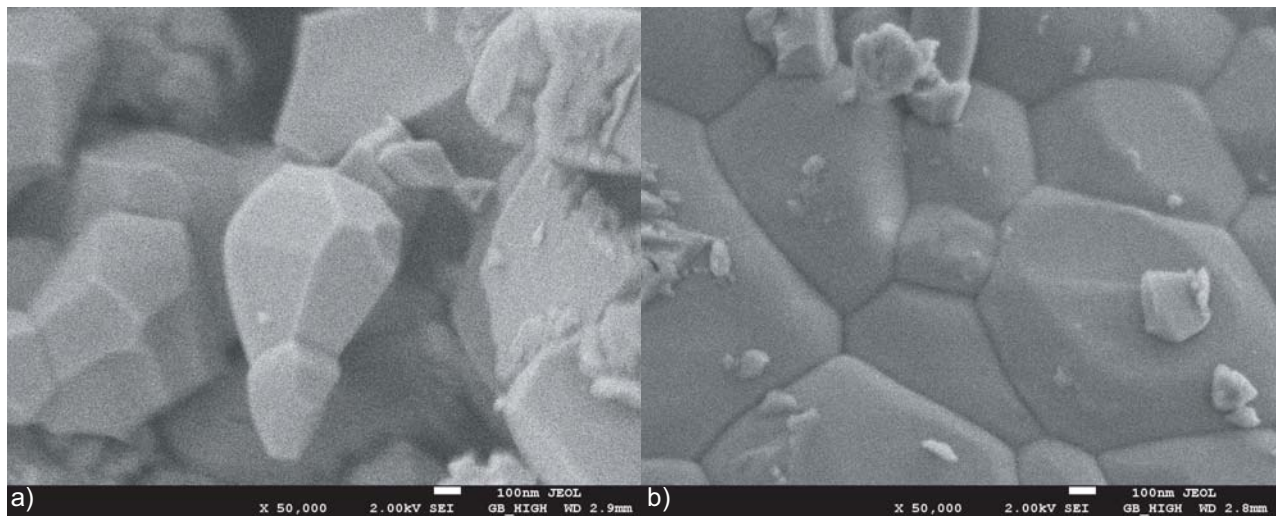


Figura 4.24: Micrografías de barrido de la muestra HA2C, con temperaturas de mezclado a 25 °C y de calcinación a 1200 °C, a) a x100k y b) a x50k.

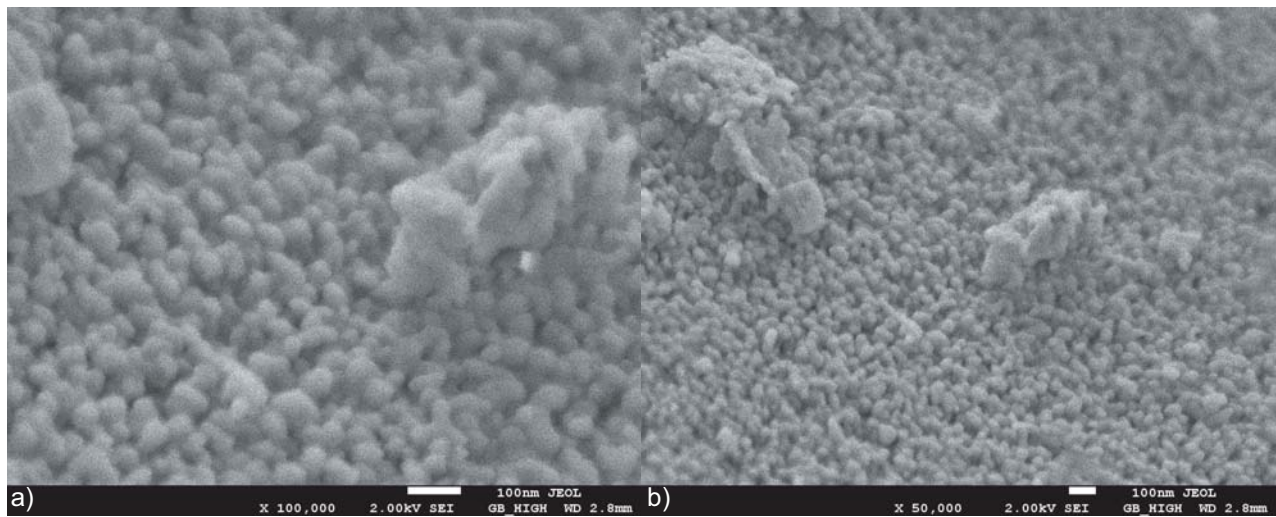


Figura 4.25: Micrografías de barrido de la muestra HA3A, con temperaturas de mezclado a 44 °C y de calcinación a 600 °C, a) a x100k y b) a x50k.

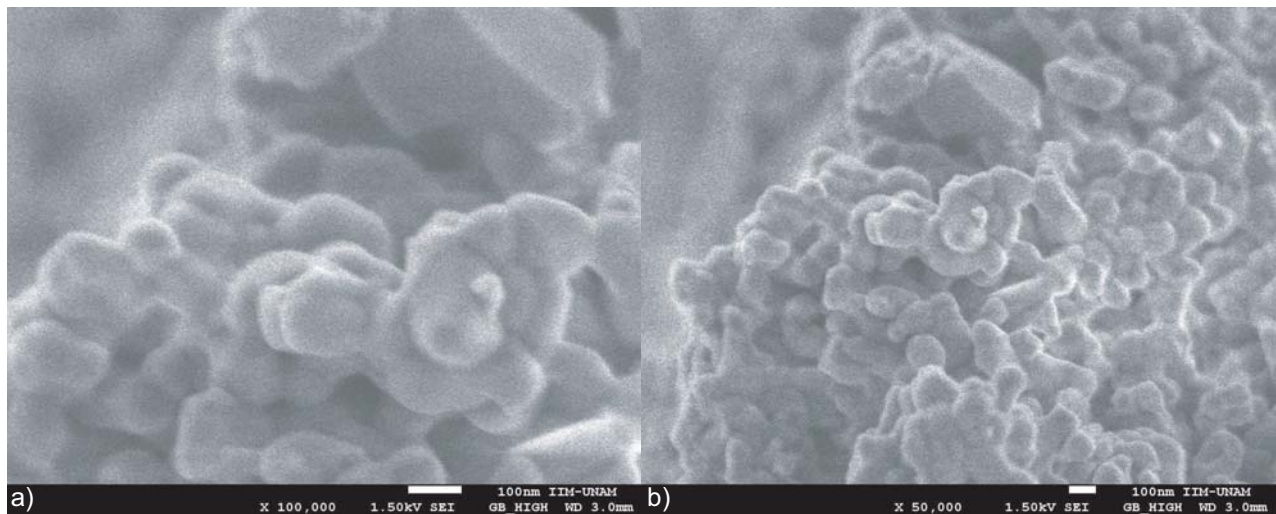


Figura 4.26: Micrografías de barrido de la muestra HA3B, con temperaturas de mezclado a 44 °C y de calcinación a 900 °C, a) a x100k y b) a x50k.



Figura 4.27: Micrografías de barrido de la muestra HA3C, con temperaturas de mezclado a 44 °C y de calcinación a 1200 °C, a) a x100k y b) a x50k.

Para estudiar la importancia del tiempo en el que se lleva a cabo el tratamiento térmico, se prepararon muestras calcinadas a 600 °C y 900 °C durante 4 horas. La temperatura de calcinación de 1200 °C no fue considerada en este análisis debido a que los cristales obtenidos con esta temperatura son mucho más grandes de los que se busca obtener en este trabajo.

Se calcinaron muestras durante 4 h, a 600°C y a 900°C, y se observó que el aumento del tiempo en el que se lleva a cabo el tratamiento térmico no influye de manera considerable en el aumento del tamaño de las partículas resultantes, mostradas en las figuras 4.28 - 4.33. Una diferencia observable en estas micrografías, es que presentan mayor grado de homogeneidad que las calcinadas a las mismas temperaturas durante dos horas (figuras 4.19 - 4.26). Las partículas calcinadas durante cuatro horas, tienen prácticamente la misma forma y el mismo tamaño (que sigue estando dentro del rango nanométrico), cosa que no sucede con las que fueron calcinadas por dos horas, en las que se puede apreciar una considerable variación en los tamaños y en la forma de partículas obtenidas.

El microscopio electrónico de barrido es capaz de hacer un análisis elemental por espectroscopia de energía dispersiva (EDS por sus siglas en inglés) de las muestras. La EDS se basa en el análisis de los rayos X emitidos por la muestra (ver figura 2.9) al ser irradiada por los electrones del SEM. Se hicieron las pruebas de EDS a los polvos, con la finalidad de estudiar la pureza de las mismas. En la figura 4.34 se presenta solo unos de los patrones obtenidos, ya que todos los demás resultaron con la misma tendencia, variando únicamente los porcentajes de cada elemento encontrado en los polvos. En la tabla 4.3 se muestran los porcentajes atómicos de cada elemento obtenidos por EDS y la relación Ca/P calculada para cada una de las muestras estudiadas. Para

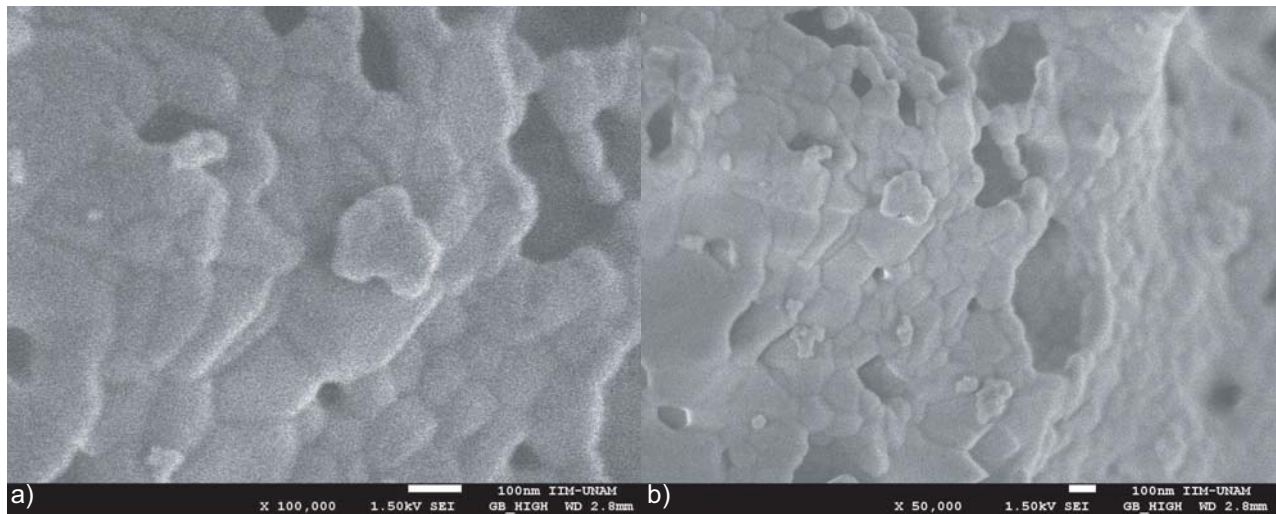


Figura 4.28: Micrografías de barrido de la muestra HA1A4, con tratamiento térmico a 600 °C durante 4 horas, a) a x100k y b) a x50k.

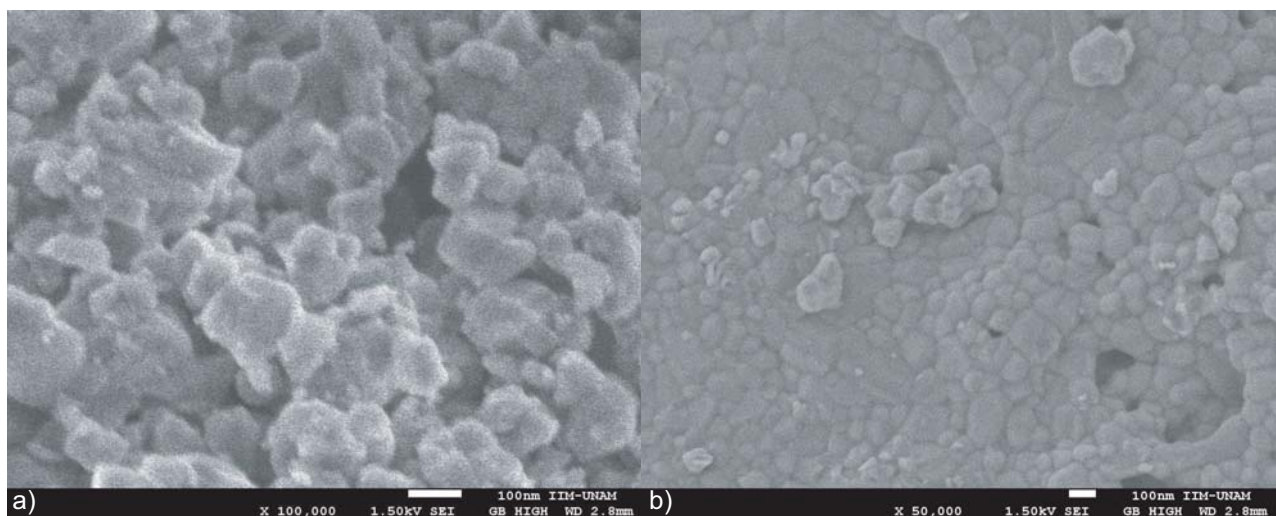


Figura 4.29: Micrografías de barrido de la muestra HA1B4, con tratamiento térmico a 900 °C durante 4 horas, a) a x100k y b) a x50k.

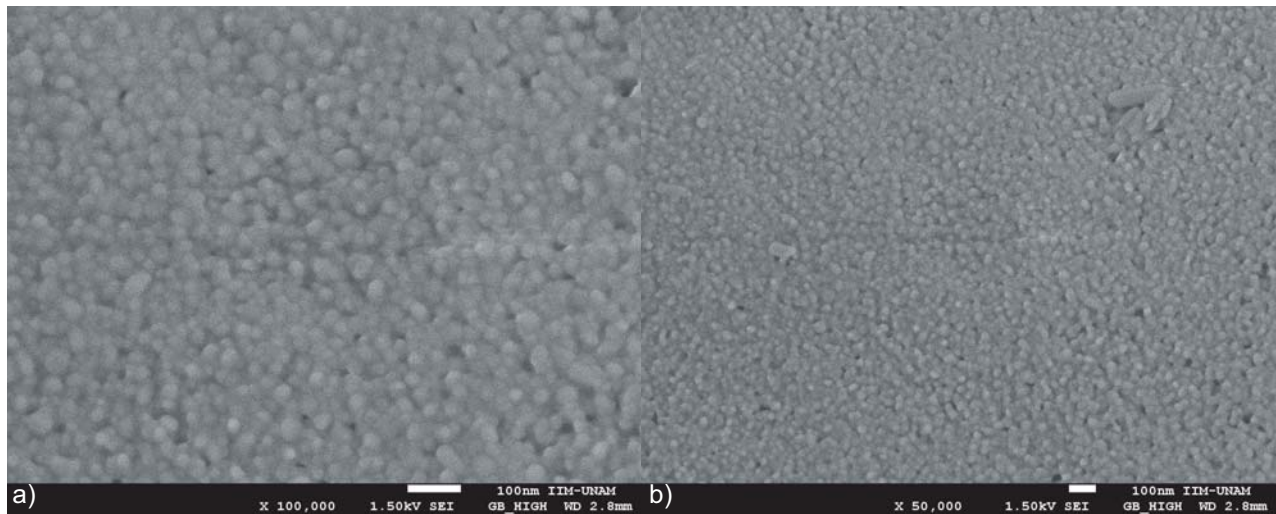


Figura 4.30: Micrografías de barrido de la muestra HA2A4, con tratamiento térmico a 600 °C durante 4 horas, a) a x100k y b) a x50k.

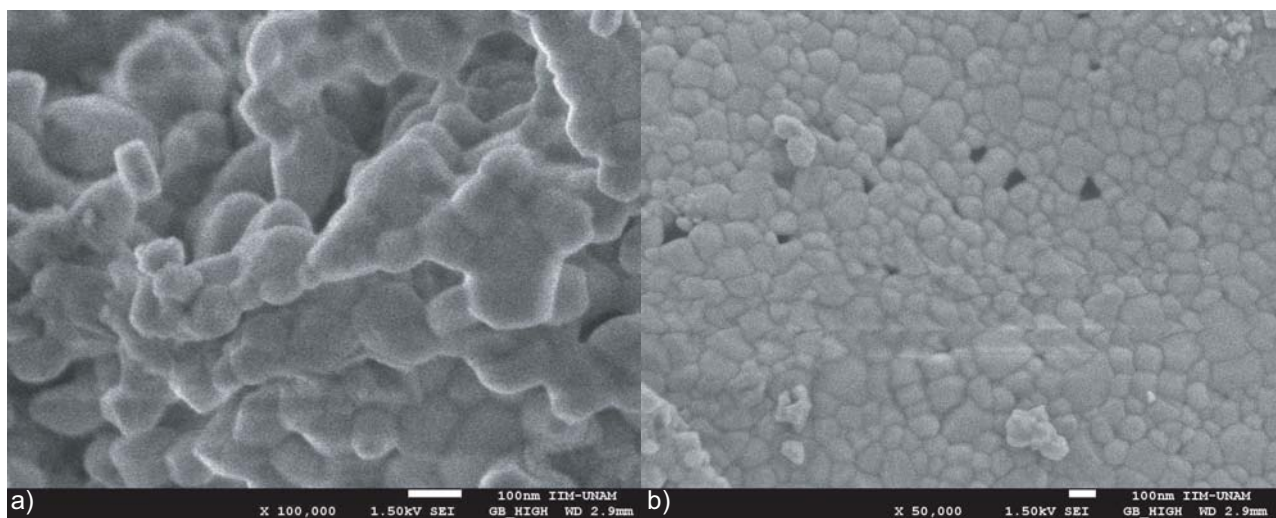


Figura 4.31: Micrografías de barrido de la muestra HA2B4, con tratamiento térmico a 900 °C durante 4 horas, a) a x100k y b) a x50k.

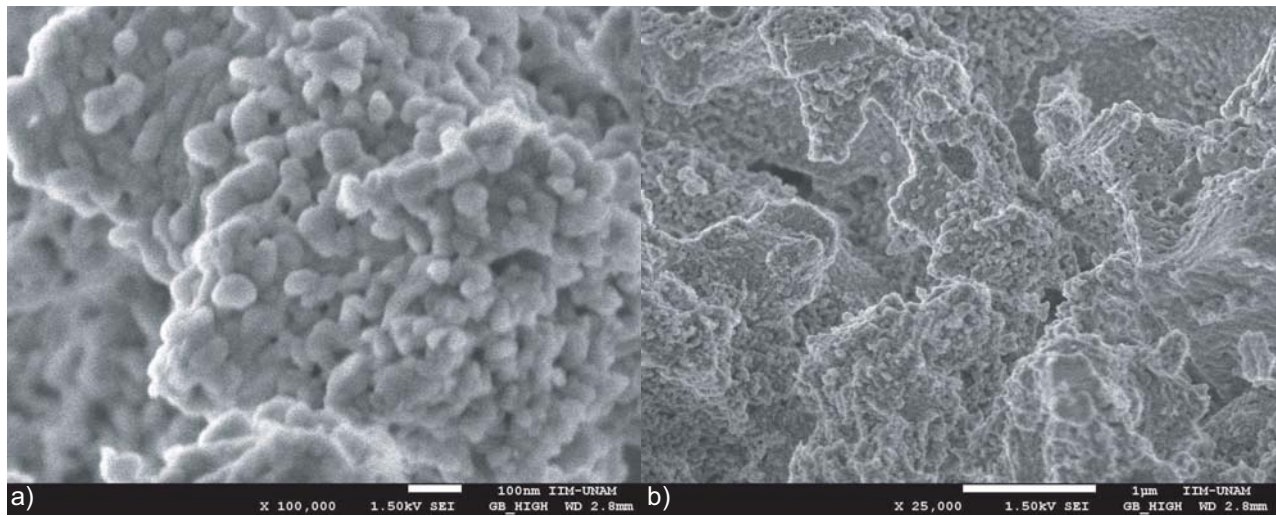


Figura 4.32: Micrografías de barrido de la muestra HA3A4, con tratamiento térmico a 600 °C durante 4 horas, a) a x100k y b) a x50k.

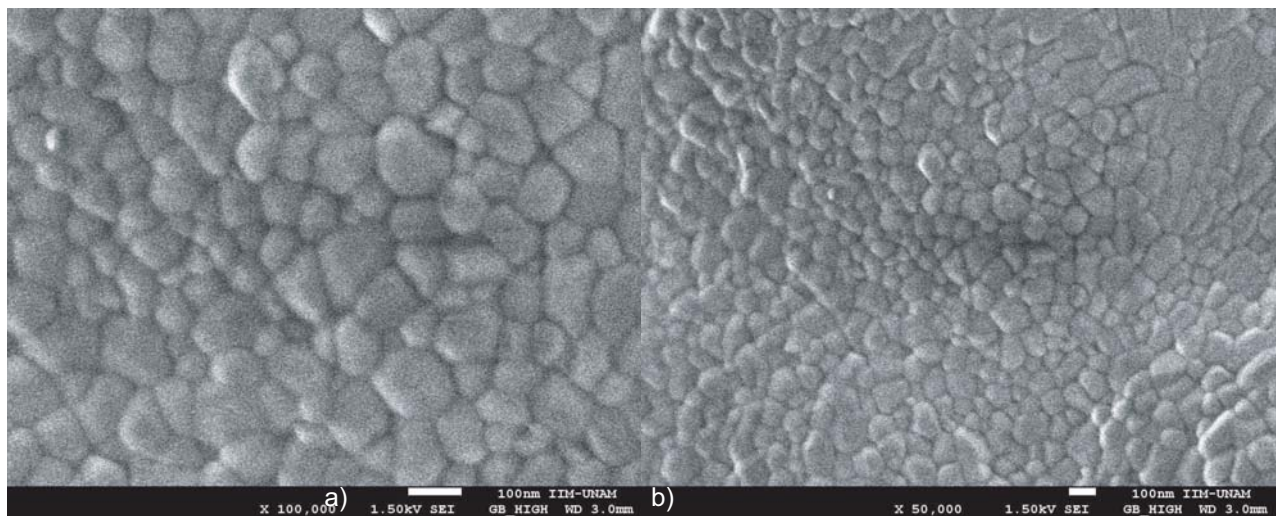


Figura 4.33: Micrografías de barrido de la muestra HA3B4, con tratamiento térmico a 900 °C durante 4 horas, a) a x100k y b) a x50k.

obtener cada uno de estos porcentajes atómicos (%O, %Ca y %P), se efectuaron tres pruebas a cada muestra en tres zonas diferentes y se hizo un promedio de los porcentajes obtenidos en los tres ensayos.

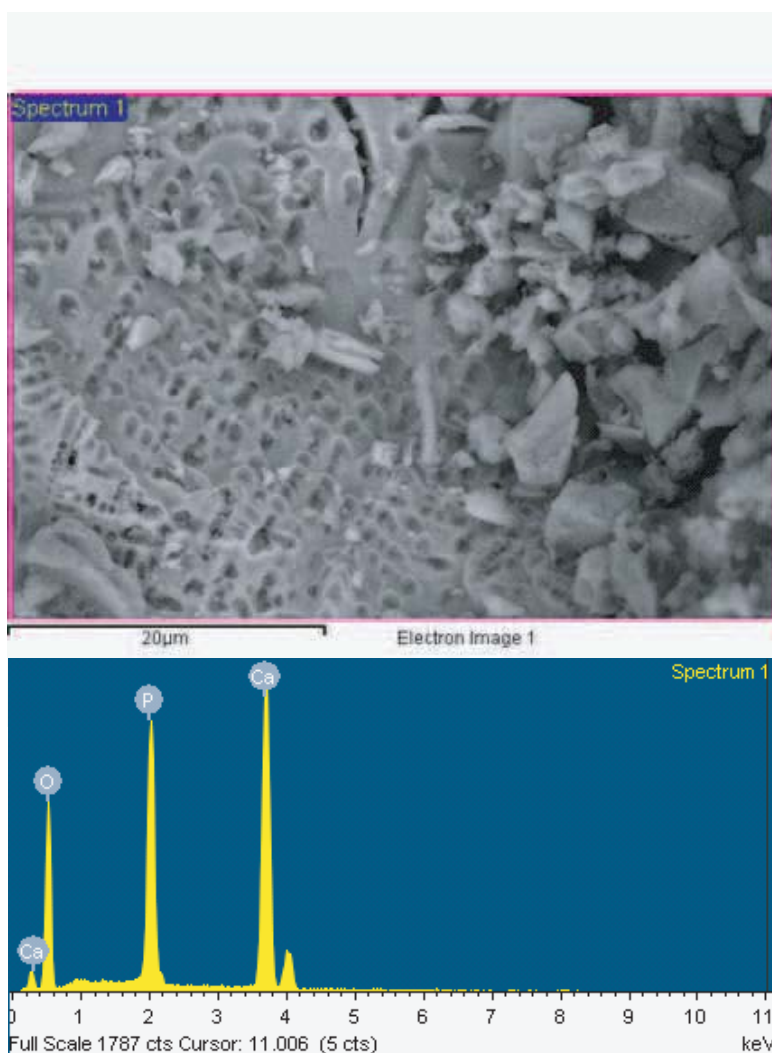


Figura 4.34: Patrón de espectroscopia de energía dispersiva de la muestra HA2A.

De acuerdo con la tabla 4.3, podemos observar que las muestras HA1A, HA1C, HA2A y HA3C tienen una relación atómica Ca/P por debajo del valor teórico ($\text{Ca/P}=1.67$), lo que se debe al exceso de fósforo en la estructura de los polvos sintetizados. Por el contrario, las muestras HA1B, HA2B, HA2C, HA3A y HA3B presentan una relación Ca/P experimental mayor a la teórica. La hidroxiapatita que se encuentra en el organismo no es estequiométrica, por lo que los valores de la relación Ca/P por encima y cercanos al valor teórico son aceptados, debido a que son cristales con exceso de calcio en los mismos. En ambos casos, en los que se presentan exceso tanto de calcio como de fósforo en las estructuras, estos defectos pueden estar alojados en el plano (0 0 1), puesto que es en este plano donde se presenta la mayor variación de los parámetros de red calculados

Tabla 4.3: Relación Ca/P calculada a partir del EDS de las muestras.

Muestra	% O	% Ca	% P	Ca/P
HA1A	69.84	18.75	11.42	1.64
HA1B	66.42	21.08	12.49	1.69
HA1C	70.58	17.89	11.53	1.55
HA2A	70.17	18.31	11.52	1.59
HA2B	67.22	20.97	11.81	1.77
HA2C	63.32	22.68	12.00	1.89
HA3A	66.47	22.18	11.36	1.95
HA3B	54.98	29.31	15.70	1.87
HA3C	69.83	17.79	12.38	1.43

experimentalmente. Es importante destacar que en todos los casos se observaron solo tres elementos para cada análisis realizado, oxígeno, calcio y fósforo, lo que nos ayuda a corroborar el grado de pureza de los materiales sintetizados, teniendo en cuenta que el equipo utilizado para el análisis (JEOL JSM-7600F) registra la presencia de elementos por encima de las 2000 ppm.

Conclusiones

Con el método presentado en este trabajo se pueden obtener nanocristales de HA a partir de un método de sol-gel modificado en el que se obtienen polvos de este material con alto grado de pureza y homogeneidad en un tiempo total de proceso de 24 horas.

La morfología de los sólidos sintetizados es granular y el tamaño de las partículas presentes en estos polvos cambia conforme se varía la temperatura de calcinación de las muestras. Se observó que el tamaño de cristales calculado mediante la ecuación de Scherrer y el tamaño de partícula observado mediante la microscopía electrónica (TEM y SEM) son congruentes, por lo que podemos concluir que las partículas presentes en los polvos son monocristalinas. Se obtuvieron los tamaños de cristales más pequeños (dentro del orden nanométrico) con la temperatura de calcinación más baja, así como los cristales de mayor tamaño (de orden micrométrico) se presentan cuando la temperatura de calcinación es de 1200 °C. La nucleación y formación de cristales se lleva a cabo a partir del aumento en la concentración de iones de calcio y fósforo en la solución coloidal.

El tamaño de cristalito obtenido mediante la ecuación de Scherrer oscila entre 40 y 90 nm. Al compararlo con las micrografías de transmisión, podemos concluir que esta ecuación es válida cuando se trabaja con cristales en el rango nanométrico (0 - 100 nm).

Los parámetros de red obtenidos experimentalmente son muy cercanos a los valores reportados en la literatura. Los parámetros de red a y b presentan mayor variación, por lo que podemos concluir que los defectos presentes se encuentran alojados en los planos (0 0 1) de la estructura. Estos defectos se deben a la presencia de un átomo de calcio o de fósforo en la posición (0 0 0) de la estructura. Se descartó la presencia de algún otro elemento sustituyente debido al alto grado de pureza de las muestras observado en la espectroscopia de energía dispersiva (EDS), en la que solo se registra la presencia de oxígeno, calcio y fósforo en los polvos.

Las condiciones más apropiadas para la síntesis de estos cristales son: una temperatura de mezcla de los precursores de 25 °C (temperatura ambiente) y calcinación a 600 °C durante 4 horas, ya que con estas condiciones se obtienen cristales del orden deseado (nanométrico) y la homogeneidad de las muestras es grande. Aunque bajo otras condiciones también se obtienen cristales de este tamaño, se escogieron éstas por el ahorro

de energía que implica obtener los polvos bajo estas condiciones.

Después de hacer el lavado de los polvos con el fin de eliminar el óxido de calcio presente en las muestras, podemos concluir que los polvos pueden ser candidatos para estudiar su biocompatibilidad por las fases presentes (hidroxiapatita, fosfato de calcio y whitlokita). Podemos decir que es un material potencialmente utilizable como biomaterial y en especial para el recubrimiento de prótesis metálicas.

Bibliografía

- [1] Park J.B., Bronzino J.D. *Biomaterials: Principles and applications*. CRC Press. United States of America. 2003
- [2] Kar A., Raja K.S., Misra M. Electrodeposition of hydroxyapatite onto nanotubular TiO_2 for implant applications. *Surface & Coatings Technology*, 201, 3723-3731, 2006
- [3] Lima R.S., Khor K.A., Li H., Cheang P., Marple B.R. HVOF spraying of nanostructured hydroxyapatite for biomedical applications. *Materials Science and Engineering A*, 396, 181-187, 2005
- [4] Trommer R.M., Santos L.A., Bergmann C.P. Alternative technique for hydroxyapatite coatings. *Surface & Coatings Technology*, 201, 9587-9593, 2007
- [5] Yang Y.C., Chang E. Measurements of residual stresses in plasma-sprayed hydroxyapatite coatings on titanium alloy. *Surface & Coatings Technology*, 190, 122- 131, 2005
- [6] Guo L., Li H. Fabrication and characterization of thin nano-hydroxyapatite coatings on titanium. *Surface & Coatings Technology*, 185, 268- 274, 2004
- [7] Descamps M., Hornez J.C., Leriche A. Manufacture of hydroxyapatite beads for medical applications. *Journal of the European Ceramic Society*, 29, 369-375, 2009
- [8] Vázquez-Hernández F., Mendoza-Barrera C., Altuzar V., Meléndez-Lira M., Santana-Aranda M.A., Olvera M. Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles and their application in protein adsorption. *Materials Science and Engineering B*, 174, 290-295, 2010

- [9] Kawasaki K., Kambara M., Matsumura H., Norde W. A comparison of the adsorption of saliva proteins and some typical proteins onto the surface of hydroxyapatite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 32, 321-334, 2003
- [10] Queiroz A.C., Santos J.D., Monteiro F.J., Gibson I.R., Knowles J.C. Adsorption and release studies of sodium ampicillin from hydroxyapatite and glass-reinforced hydroxyapatite composites. *Biomaterials*, 22, 1393-1400, 2001
- [11] Diana T., Wassell H., Rachel C., Embery G. Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite. *Biomaterials*, 16, 697-702, 1995
- [12] Mizushima Y., Ikoma T., Tanaka J., Hoshi K., Ishihara T., Ogawa Y., Ueno A. Injectable porous hydroxyapatite microparticles as a new carrier for protein and lipophilic drugs. *Journal of Controlled Release*, 110, 260 - 265, 2006
- [13] Stötzel C., Müller F.A., Reinert F., Niederdraenk F., Barralet J.E., Gbureck U. Ion adsorption behaviour of hydroxyapatite with different crystallinities. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74, 91-95, 2009
- [14] Shen J.W., Wu T., Wang Q., Pan H.H. Molecular simulation of protein adsorption and desorption on hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials*, 29, 513-532, 2008
- [15] Lin K., Pan J., Chen Y., Cheng R., Xu X. Study of the adsorption of phenol from aqueous solution on hydroxyapatite nanopowders. *Journal of Hazardous Materials*, 161, 231-240, 2009
- [16] Yin A., Margolis H.C., Grogan J., Yao Y., Troxler R.F., Oppenheim F.G. Physical parameters of hydroxyapatite adsorption and effect on candidacidal activity of histatins. *Archives of Oral Biology*, 48, 361-368, 2003
- [17] Vila M., Sanchez-Salcedo S., Cicuendez M., Izquierdo-Barba I., Vallet-Regi M. Novel biopolymer coated hydroxyapatite foams for removing heavy-metals from polluted water. *Journal of Hazardous Materials*, 192, 71- 77, 2011
- [18] Coreño J., Mújica J.M., Hernández D., Herrera A.M., García S. Evaluación de hidroxiapatita nanoparticulada como material adsorbente de iones flúor, plomo y arsénico en soluciones acuosas. *Superficies y Vacío*,

23(S), 161-165, 2010

- [19] Masmoudi S., Ben Amar R., Larbot A., El Feki H., Ben Salah A., Cot L. Elaboration of inorganic microfiltration membranes with hydroxyapatite applied to the treatment of wastewater from sea product industry. *Journal of Membrane Science*, 247, 1-9, 2005
- [20] Solhy A., Tahir R., Sebti S., Skouta R., Bousmina M., Zahouily M., Larzek M. Efficient synthesis of chalcone derivatives catalyzed by re-usable hydroxyapatite. *Applied Catalysis A: General*, 374, 189-193, 2010
- [21] Smahi A., Solhy A., El Badaoui H., Amoukal A., Tikad A., Maizi M., Sebti S. Potassium fluoride doped fluorapatite and hydroxyapatite as new catalysts in organic synthesis. *Applied Catalysis A: General*, 250, 151-159, 2003
- [22] Ogo S., Onda A., Yanagisawa K. Selective synthesis of 1-butanol from ethanol over strontium phosphate hydroxyapatite catalysts. *Applied Catalysis A: General*, 402, 188- 195, 2011
- [23] Kim S.S., Sun M., Jeon O., Yong C., Kim B.S. Poly(lactide-c-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27, 1399-1409, 2006
- [24] Kaito T., Myoui A., Takaoka K., Saito N., Nishikawa M., Tamai N., Ohgushi H., Yoshikawa H. Potentiation of the activity of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration by a PLA-PEG/hydroxyapatite composite. *Biomaterials*, 26, 73-79, 2005
- [25] Sun F., Zhou H., Lee J. Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, Article in press, 2011
- [26] Domínguez Alonso A., *Respuesta del tejido óseo al biomaterial Nukbone*, Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad Simón Bolívar, México D.F. 2007
- [27] Schneck D.J., Bronzino J.D. *Biomechanics: Principles and applications*. CRC Press. United States of America. 2003

- [28] Kumar V., Abbas A., Fausto N. *Pathologic basis of disease*. Elsevier Saunders. Seventh Edition. China 2005; 1278-1314
- [29] García Negrete C., *Síntesis de nanopartículas de $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ y Al_2O_3 para el desarrollo de sólidos porosos de interés biomédico*, Tesis de maestría. Facultad de ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Medellín 2009
- [30] Guzmán Vázquez C., *Síntesis y caracterización de hidroxiapatita por procedimientos de vía húmeda*, Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones en Materiales. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 2004
- [31] Monroy Ortega O., *Succinatos de cinc y cadmio como adsorbentes de moléculas pequeñas*, Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 2010
- [32] González R., Pareja R., Ballesteros C. *Microscopia electrónica*. Eudema. Madrid, España. 1991
- [33] Meza Arredondo D., *Síntesis y caracterización de cristales de hidroxiapatita*, Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 2010
- [34] Shadanbaz S., Dias G. Calcium phosphate coatings on magnesium alloys for biomedical applications: a review. *Acta Biomaterialia*, 8, 20-30, 2012