



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTUDIO DE HUESOS ANTIGUOS Y MODERNOS:  
MORFOLOGIA, ESTRUCTURA Y APORTACIONES  
AL ESTUDIO DE BIOMATERIALES"

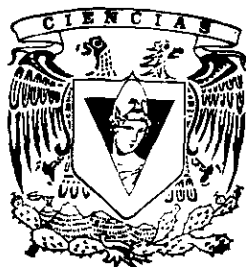
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**ALEJANDRO HEREDIA BARBERO**



DIRECTOR: DR. LAURO BUCIO GALINDO

264307

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"ESTUDIO DE HUESOS ANTIGUOS Y MODERNOS: MORFOLOGIA,  
ESTRUCTURA Y APORTACIONES AL ESTUDIO DE BIOMATERIALES"

realizado por ALEJANDRO HEREDIA BARBERO

con número de cuenta 9557626-4 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

DR. LAURO BUCIO GALINDO

*Lauro Bucio*

Propietario

DRA. MARGARITA VICTORIA GARCIA GARDUÑO

*Margarita Victoria Garcia Garduño*

Propietario

DRA. PATRICIA RIVAS MANZANO

*Patricia Rivas Manzano*

Suplente

M. EN C. ALICIA ZARZOSA PEREZ

*Alicia Zarzosa Perez*

Suplente

DR. ENRIQUE BUZO CORDOVA

*Enrique Buzo Cordova*

FACULTAD DE CIENCIAS  
U. N. A. M.

Consejo Departamental de BIOLOGIA

*Edna Maria Suarez Diaz*

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ.



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

A mis padres, mis hermanos, hermanas y camaradas. Que siempre me acompañaron y estoy seguro de que seguirán acompañándome, siempre compartiendo conocimiento y *discusiones*.

A todas las personas que, pensando en los demás, han intentado (o intentaron) mediante cualquier recurso, defender los intereses y bienes de toda la humanidad, es decir, de todos los hombres y todas las mujeres, y en este intento han caído en combate o están presos.

A toda la gente del pueblo mexicano por haber sustentado mi beca P.A.P.I.I.I. por medio de la D.G.A.P.A. de nuestra Universidad Nacional Autónoma de México.

A todas las personas que directa o indirectamente participaron en el movimiento 1999-2000 por defender la Universidad Pública y que nunca dudaron de la legitimidad de las demandas.

A la memoria de Carlos Marx, Federico Engels y V.I. Lenin, todos ellos críticos del capitalismo e iniciadores de la ciencia contemporánea.

## AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Lauro Bucio Galindo, al Dr. Eligio A. Orozco Mendoza, a la Dra. Margarita V. García Garduño, a la Dra. Patricia Rivas Manzano a la M. en C. Alicia Zarzosa Pérez, al Dr. Enrique Buzo Córdova; quienes son los responsables reales de haber terminado, tal como está, el presente trabajo cumpliendo el papel de sinodales.

A Roberto Hernández, Pedro Mexía, Jaqueline Cañetas, José Reyes y Eduardo Villarreal por su ayuda en las imágenes de microscopía electrónica, a Genoveva Hernández y Rodrigo Velázquez por las espectroscopias, a Luis Lozano, José Ocotlán y Miguel Angel Peña por los análisis térmicos, a Edilberto Hernández por su ayuda técnica en los análisis de difracción de rayos X, también a José Luis Ruvalcaba por los análisis nucleares, y a Miguel Bustos por su muy valiosa y permanente ayuda técnica.

A todas las personas que nos apoyaron dándonos muestras de tejido óseo.

ESTUDIO DE HUESOS ANTIGUOS\* Y MODERNOS\*:  
MORFOLOGÍA, ESTRUCTURA Y APORTACIONES AL ESTUDIO DE BIOMATERIALES

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES SOBRE EL TEJIDO ÓSEO
  - 1.1. Microestructura ósea
  - 1.2. Colágena en hueso
  - 1.3. Fase mineral en hueso
    - 1.3.1. Estructura de la Hidroxiapatita (Hap) sintética
    - 1.3.2. Morfología de la fase mineral
  - 1.4. Iones y fases inorgánicas presentes en hueso
  - 1.5. Propiedades físicas, químicas y biológicas del hueso
  - 1.6. Modelos estructurales propuestos en la literatura para el carbonato de hidroxiapatita
    - 1.6.1. Carbonato de Hidroxiapatita
    - 1.6.2. Características estructurales del ion Carbonato
  - 1.7. Hueso Antiguo
    - 1.7.1. Fechamiento por Colágeno residual
2. TÉCNICAS PROPUESTAS PARA EL ANÁLISIS DE MATERIAL ÓSEO
  - 2.1. Difracción de Rayos X
  - 2.2. Tratamientos Químicos
  - 2.3. Tratamientos Térmicos
  - 2.4. Técnicas nucleares. P.I.X.E. y R.B.S.
  - 2.5. Microscopía Electrónica de Barrido (M.E.B)
  - 2.6. Espectroscopías Raman e Infrarroja
  - 2.7. Fechamiento por XRD. Método de índice de Cristalinidad y Colágeno residual. El uso de la técnica de Difracción de Rayos X aplicada al fechamiento
    - 2.7.1. Colágeno residual
    - 2.7.2. Índice de cristalinidad
3. MATERIALES Y MÉTODOS
  - 3.1. Preparación de muestras y condiciones experimentales
    - 3.1.1. Experimentos de Difracción de Rayos X
    - 3.1.2. Métodos de separación
    - 3.1.3. Centrifugación y tratamiento térmico
    - 3.1.4. Experimentos de Análisis Térmico (DSC y TGA)

\*Ver glosario.

- 3.1.5. Técnicas Nucleares: P.I.X.E. y R.B.S.
  - 3.1.6. Microscopía Electrónica de Barrido (M.E.B)
  - 3.1.7. Espectroscopías Raman e Infrarroja
  4. RESULTADOS
    - 4.1. Modelo propuesto en este trabajo para la inclusión de  $\text{CO}_3^{2-}$
    - 4.2. Análisis del modelo propuesto por el método Rietveld
    - 4.3. Análisis por el método de Rietveld de huesos modernos
    - 4.4. Análisis de hueso; hidroxiapatita y fase amorfa
    - 4.5. Relación de los tratamientos térmicos y químicos con la estabilidad del material óseo
      - 4.5.1. Tratamientos y Análisis térmicos
      - 4.5.2. Tratamientos químicos
    - 4.6. Análisis elemental por técnicas nucleares
      - 4.6.1. R.B.S - P.I.X.E. Simultáneos; P.I.X.E. para Calcio y Fósforo; R.B.S. para Oxígeno y Carbono
    - 4.7. Datos de Microscopía Electrónica de Barrido
    - 4.8. Datos de Espectroscopías Raman e Infrarroja
    - 4.9. Relación del Índice de Cristalinidad con Microestructura en la cHAp y antigüedad de huesos arqueológicos
  5. DISCUSIÓN
    - 5.1. Modelo de inclusión de ion Carbonato
    - 5.2. Análisis de huesos modernos
    - 5.3. Difracción de rayos X en colágena tipo I amorfa
    - 5.4. Generación de fases inorgánicas y estabilidad térmica del material óseo.
      - 5.4.1. Fases inorgánicas.
      - 5.4.2. Estabilidad térmica del material óseo
    - 5.5. Microestructura y fechamiento.
    - 5.6. Análisis elementales por técnicas nucleares
    - 5.7. Interacciones Colágena I-cristal
    - 5.8. Microscopía electrónica
  6. CONCLUSIONES
- GLOSARIO
- REFERENCIAS
- Apéndice: Índices de Miller (h, k, l)
- Apéndice: Método Rietveld

[...] CUALESQUIERA QUE SEAN LAS FORMAS CON SE ENCUBRA A LA REPÚBLICA, AUNQUE SE TRATE DE LA REPÚBLICA MÁS DEMOCRÁTICA, SI ES BURGUESA, SI EN ELLA CONTINÚA EXISTIENDO LA PROPIEDAD PRIVADA SOBRE LA TIERRA Y LAS FÁBRICAS Y SI EL CAPITAL PRIVADO MANTIENE EN ESCLAVITUD ASALARIADA A TODA LA SOCIEDAD, [...] ENTONCES TAL ESTADO ES UNA MÁQUINA DESTINADA A LA OPRESIÓN DE UNOS POR OTROS. Y ESTA MÁQUINA LA PONDREMOS EN MANOS DE AQUELLA CLASE QUE DEBE DERROCAR EL PODER DEL CAPITAL. RECHAZAREMOS TODOS LOS VIEJOS PREJUICIOS DE QUE EL ESTADO ES LA IGUALDAD PARA TODOS, PUES ESTO ES UN ENGAÑO: MIENTRAS EXISTA LA EXPLOTACIÓN, NO PUEDE HABER IGUALDAD. EL TERRATENIENTE NO PUEDE SER IGUAL AL OBRERO, EL HAMBRIENTO NO PUEDE SER IGUAL AL HARTO. ESA MÁQUINA, LLAMADA ESTADO, ANTE LA CUAL LA GENTE SE DETIENE CON RESPETO SUPERSTICIOSO, DANDO FE A LOS VIEJOS CUENTOS DE QUE ES EL PODER DE TODO EL PUEBLO, EL PROLETARIADO LA RECHAZA, DICRIENDO QUE ES UNA MENTIRA BURGUESA. NOSOTROS ARREBATAMOS ESTA MÁQUINA A LOS CAPITALISTAS Y NOS APROPIAMOS DE ELLA. CON ESTA MÁQUINA O GARROTE DESTRUIREMOS TODA EXPLOTACIÓN; Y CUANDO EN EL MUNDO NO HAYA QUEDADO LA POSIBILIDAD DE EXPLOTAR, NO HAYAN QUEDADO MÁS PROPIETARIOS DE LA TIERRA Y DE FÁBRICAS, NO OCURRA QUE UNOS SE HARTAN MIENTRAS OTROS PADECEN HAMBRE, SOLAMENTE CUANDO ESTO YA NO SEA POSIBLE ARROJAREMOS ESTA MÁQUINA AL MONTÓN DE LA CHATARRA. ENTONCES NO HABRÁ ESTADO Y NO HABRÁ EXPLOTACIÓN [...].

V.I. Lenin. 1988. *Acerca del Estado*. En: "Obras completas" T.39, págs 69-90. Ed. Progreso, Moscú.

"PERSONAS REALMENTE CONVENCIDAS DE HABER  
IMPULSADO LA CIENCIA, NO RECLAMARÍAN LIBERTAD PARA  
LAS NUEVAS CONCEPCIONES  
AL LADO DE LAS ANTIGUAS, SINO LA SUSTITUCIÓN DE  
ESTAS ÚLTIMAS POR LAS PRIMERAS"

V.I. Lenin. 1977. *¿Qué hacer?* Editorial el hombre y su tiempo.

## RESUMEN

En este trabajo se hace un estudio de tipo morfológico y estructural, en la apatita biológica procedente de huesos de distintas antigüedades y clases de Vertebrados; estudio que incluye la propuesta de un modelo para la estructura del carbonato de hidroxapatita, acorde con las variaciones obtenidas experimentalmente de los parámetros reticulares de muestras procedentes de distintos organismos.

Este trabajo incluye técnicas de análisis muy variadas (análisis térmico, tratamientos térmicos, tratamientos químicos, espectroscopía Raman e Infrarroja, microscopía electrónica de barrido, análisis nucleares y difracción de rayos X), y de estas sobresale la técnica de difracción de rayos X. Esta ofrece la posibilidad de estudiar estructuralmente fases cristalinas y en cierta medida fases amorfas. Estas últimas mediante el uso de la llamada ecuación de Debye, aplicada exitosamente en el presente trabajo, al analizar tejido óseo íntegro (sin tratamiento), en el cual se tienen presentes las fases más características de este tejido, la del carbonato de hidroxapatita (cristalina) y la correspondiente a la colágena tipo I (amorfa).

Se debe señalar que el uso de tratamientos térmicos a altas temperaturas en tejido óseo antiguo, con el fin de generar cambios de masa, debido a la calcinación de la colágena tipo I, han sido ocupados para implementar técnicas de fechamiento relativo con cierto éxito ("Método de Fechamiento por colágeno residual". Vento, *et al.* 1981). Ello motivó a que en el presente trabajo se implementara una técnica para semicuantificar la fase orgánica con respecto a la inorgánica, examinando los correspondientes espectros de difracción de rayos X de tejido óseo antiguo íntegro (sin tratamiento) y así obtener una evaluación por otra técnica, del método de fechamiento relativo por colágeno residual.

Con el mismo interés de fechar material óseo, hay autores (Bartsiokas & Middleton, 1992, Person, *et al.* 1995) que han propuesto una relación analítica de tipo logarítmico entre la antigüedad de las muestras y el llamado índice de cristalinidad. Este último (obtenido por técnicas de difracción de rayos X por polvos) está relacionado con las características morfológicas de los cristales de carbonato de hidroxapatita; propuesta de fechamiento que también ha sido analizada en el presente estudio enfatizando adicionalmente la estrecha relación entre el índice de cristalinidad y la morfología de los microcristales.

## INTRODUCCIÓN

El tejido óseo es hasta hace poco tiempo, una herramienta de cuantificación temporal para entierros y eventos históricos; así como modelo para el diseño de nuevas estructuras en ingeniería de biomateriales. Las estructuras mineralizadas en sistemas biológicos son muy comunes y como toda estructura biológica está sometida a procesos evolutivos que las modifican de manera constante. Un caso muy común es el del tejido óseo, el cual se estudia generalmente desde su macroestructura, es decir, lo que se considera exclusivamente anatomía. Para el diseño de una nueva estructura, con fines de implantación deben integrarse estudios biológicos que describan y expliquen la evolución, los procesos bioquímicos y biofísicos relacionados a este tejido, de tal forma que podamos generar un material lo más parecido, en forma y función, al tejido que se pretende sustituir. Situación que no se hace en los estudios de ciencia de materiales, por el uso de pocas variables, alejando estos tipos de análisis de los sistemas vivos. Lo anterior se debe, principalmente, a la imposibilidad de hacer nuevas líneas de estudio, que sin abandonar el reduccionismo, puedan dar respuestas a problemas biológicos; como la posición de un ion en una estructura mineral biológica, como varía esta microestructura con respecto al tiempo en el organismo o en un proceso de fosilización, o cómo se da la interacción entre dos estructuras biológicas que tienen múltiples funciones; y es de gran importancia para un grupo muy diverso de organismos vivos, estos son, los vertebrados.

La importancia del tejido óseo en los vertebrados consiste en que es un almacén de sustancias inorgánicas relacionadas al metabolismo y confiere la protección y sostén de órganos y tejidos. En términos biológicos, es una estructura muy común que parece ha dado la posibilidad de invadir nuevos ambientes, haciendo independientes a los organismos del medio acuático. Este tejido es considerado, en ciencia de materiales un *composite*, con principalmente dos fases, que son las fibras de colágena y el carbonato de hidroxiapatita (CHAp), (Ozin, *et al.* 1997). Esta última fase (mineral e inorgánica) se encuentra en forma cristalina, es cerca del 70% del peso seco total del tejido óseo y su estructura cristalina no es conocida con todo detalle, aunque se sabe que esta pertenece al tipo estructural de las apatitas, con simetría hexagonal.

Dentro de las apatitas, es la hidroxiapatita,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ , en la que se basan generalmente los estudios de síntesis y diseño de materiales (Mann, S. 1993, Merry, J.C., *et al.* 1998). Para estudiar el carbonato de hidroxiapatita, se han empleado técnicas como la de difracción de rayos X para polvos con el fin de obtener sus parámetros estructurales. De esta fase, existen varios modelos que describen la inclusión del ion carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), acompañada posiblemente de otros iones como sodio ( $\text{Na}^+$ ), Potasio ( $\text{K}^+$ ), oxhidrilo o hidroxilo (OH), etc., dentro de la estructura apatita. Como consecuencia de esas inclusiones iónicas, la apatita biológica adquiere diversas propiedades que resultan difíciles de reproducir en compuestos sintéticos (Zapanta-LeGeros, 1965). En virtud de ello, en este trabajo se hace un estudio de tipo morfológico y estructural, en la apatita biológica procedente de huesos antiguos y modernos; estudio que incluye la propuesta de un modelo para la estructura del carbonato de hidroxiapatita, acorde con las variaciones que pudieran encontrarse en los parámetros reticulares de muestras procedentes de distintos organismos.

Para analizar exclusivamente la apatita biológica, se le requiere separar de la fase orgánica (colágena tipo I), en la cual se encuentra embebida, resultando de suma utilidad el uso de distintas técnicas químicas y térmicas de separación, que han sido aplicadas en el presente trabajo. De esta manera el modelo a proponer para el carbonato de hidroxiapatita se puede estudiar ventajosamente mediante el análisis de su espectro de difracción de rayos X al no estar presente la fase orgánica.

La técnica de difracción de rayos X también ofrece la posibilidad de estudiar estructuralmente fases cristalinas y en cierta medida fases amorfas. Estas últimas mediante el uso de la llamada ecuación de Debye, aplicada exitosamente en el presente trabajo, al analizar tejido óseo íntegro (sin tratamiento), en el cual se tienen presentes ambas fases, el carbonato de hidroxiapatita (cristalina) y colágena tipo I (amorfa).

Por otro lado, se debe señalar que el uso de tratamientos térmicos a altas temperaturas en tejido óseo antiguo, con el fin de generar cambios de masa, debido a la calcinación de la colágena tipo I, han sido ocupados para implementar técnicas de fechamiento relativo con cierto éxito ("Método de Fechamiento por colágeno residual". Vento, *et al.* 1981). Ello motivó a que en el presente trabajo se implementara una técnica para semicuantificar la fase orgánica con respecto a la inorgánica, examinando los correspondientes espectros de difracción de rayos X de tejido óseo antiguo íntegro (sin tratamiento) y así obtener una evaluación por otra técnica, del método de fechamiento relativo por colágeno residual. Con el mismo interés de fechar material óseo, hay autores que han propuesto una relación analítica de tipo logarítmico entre la antigüedad de las muestras y el llamado índice de cristalinidad (Bartsiokas & Middleton, 1992, Person, *et al.* 1995). Este último (obtenido por técnicas de difracción de rayos X por polvos) está relacionado con las características morfológicas de los cristales de carbonato de hidroxiapatita; propuesta de fechamiento que también ha sido analizada en el presente estudio enfatizando adicionalmente la estrecha relación entre el índice de cristalinidad y la morfología de los microcristales.

En síntesis, los objetivos propuestos para la presente investigación contemplan el estudio de huesos antiguos y modernos, en lo que respecta a su morfología y estructura, bajo la óptica de las posibles aportaciones al estudio de biomateriales. De esta manera, los principales puntos propuestos como objetivos fueron los siguientes:

1. Establecer un modelo estructural para la incorporación del ion carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) dentro de la estructura de la apatita (técnicas experimentales empleadas: difracción de rayos X por polvos, espectroscopías Raman e infrarroja).
2. Aislar la fase mineral, carbonato de hidroxiapatita, usando técnicas químicas y térmicas para llevar a cabo el punto anterior
3. Establecer los cambios en la celda unidad de las muestras óseas mediante el uso de la metodología de Rietveld, para el análisis de espectros de difracción de rayos X por polvos policristalinos, con el objeto de que el modelo propuesto para inclusión de ion

carbonato, más la posible compañía de otro ion, pueda explicar la diversidad de sustituciones iónicas generadas de forma natural (además de la técnica de difracción de rayos X, se usaron técnicas nucleares para llevar a cabo un análisis químico elemental).

4. Aplicación de la ecuación de Debye para modelar la intensidad de rayos X dispersada por la componente amorfa (colágena tipo I) presente en el tejido óseo (en los espectros de difracción de rayos X de polvo de tejido óseo).
5. Aplicación de un análisis semicuantitativo para establecer la proporción de colágena en tejido óseo (experimentos de difracción de rayos X).
6. Implementar la metodología citada en el punto anterior para evaluar la aplicabilidad del método de fechamiento relativo por colágeno residual (Vento, *et al.*1981) en material óseo antiguo (difracción de rayos X).
7. Establecer si el uso del índice de cristalinidad (Método de Bartsiokas & Middleton, 1992) resulta reproducible para fechamiento de material óseo antiguo (difracción de rayos X).

En el capítulo 1 (Generalidades sobre tejido óseo) se ofrecen los conocimientos para poder entender el papel que juega este trabajo dentro la investigación sobre tejido óseo, así como el fundamento teórico de las técnicas empleadas en la metodología experimental de la presente investigación.

En el capítulo 2 (Materiales y Métodos) se plantean los procedimientos que se relacionan con la preparación de muestras y las condiciones bajo las cuales se llevaron a cabo los experimentos.

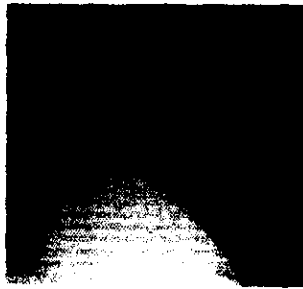
El capítulo 3 (Resultados) contiene los resultados obtenidos. En el capítulo 4 (Discusión) se hace una discusión de los resultados presentados en el capítulo 3.

Finalmente, en el capítulo 5 (Conclusiones) se presentan las conclusiones principales, dando los alcances y posibilidades de las técnicas usadas en el análisis de tejido óseo y las principales aportaciones al estudio de biomateriales.

## I. GENERALIDADES SOBRE EL TEJIDO ÓSEO

El hueso constituye un tipo muy denso y especializado de tejido conjuntivo. Como un hormigón armado, la matriz ósea es una mezcla de fibras resistentes (que soportan las fuerzas de tensión) que son principalmente fibras de colágena (ver figura 1), y de partículas sólidas, principalmente carbonato de hidroxapatita, entre otros fosfatos de calcio, que resisten la compresión.

En el vertebrado adulto ya se ha mineralizado cerca del 60% del peso seco corporal, siendo esta estructura el esqueleto. El volumen ocupado por las fibras de colágena es aproximadamente igual al que ocupa la fase mineral (las partículas sólidas). En el hueso, las fibrillas de colágena se ordenan en capas regulares en forma estratificada, de tal manera que las fibrillas de cada capa se disponen paralelas entre sí, y perpendiculares respecto a las fibrillas de las capas contiguas (fig.1).



*Fig.1. Se observan las fibrillas de colágena tipo I. Micrografía electrónica de hueso fetal desmineralizado (11,000x) (Tomado de Grynpas, 1977)*

El hueso únicamente puede crecer por aposición, es decir, mediante el depósito de matriz adicional y de células sobre las superficies libres del tejido duro, esto es, que hay un tejido anterior sobre el cual se forma un nuevo tejido. Lo anterior se debe a que las células osificadas ya no pasan por mitosis y más bien funcionan como sustrato para el desarrollo de otras que se adicionan (Carter,1990).

La matriz ósea es secretada por los osteoblastos, que se hallan en la periferia de la matriz existente y depositan nuevas capas de hueso sobre ellas. Las células englobadas en esta matriz, de colágena I, forman junto con ella el material osteoide, que posteriormente se calcifica. Las células incluidas en el material óseo calcificado son, llamadas ahora osteocitos. La matriz ósea se genera por los osteoblastos y se erosiona por los osteoclastos. Los osteoclastos son células polinucleadas originadas de células madre hematopoyéticas (Alberts, *et al.* 1994.). La función de los osteocitos es mantener en buenas condiciones la matriz ósea, siendo esto una suposición generada a partir de la poca cantidad de retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi en este tipo celular (Cormack, 1986)

Las funciones que realiza el tejido óseo son muy variadas; puede fungir como un soporte, una palanca, un tejido de unión, un protector, un almacén de calcio, un contenedor del tejido hemopoyético, etc.

### 1.1. Microestructura ósea

En el hueso hay algunos tipos celulares y tipos de materiales constituyentes, de tal modo que microscópicamente, y de forma estructural, se considera a la osteona (fig. 2) como unidad funcional estructural y casi permanente del hueso. Esta estructura se ve como distintas capas de material mineral con forma de túneles concéntricos, y en cada línea axial que determina un túnel se observan células, los osteocitos (Tatárinov, 1976). No siempre en hueso encontramos osteonas, sólo en hueso compacto. Las osteonas también se denominan sistemas haversianos y corren paralelamente al eje longitudinal del hueso, y puede observarse en estos un vaso central que irriga de nutrientes a los osteocitos situados en sus respectivas lagunas. Perpendicularmente al eje longitudinal, y de forma radial, corren los canales de Volkmann, por los que pasan vasos sanguíneos, que son extensiones de los vasos procedentes de los canales de Havers. Como todo tejido, está abastecido de nervios, vasos sanguíneos y linfáticos (Cornack, 1986).



*Fig.2. Representación esquemática de las osteonas o sistemas de Havers (2) del tejido óseo. Se puede observar hueso esponjoso (1) la gran vascularización (3), osteocitos (4) y las capas concéntricas (5) características de este tejido (Tomado de: Enciclopedia visual Salvat, 1970).*

## 1.2. Colágena en hueso

La colágena es una familia de proteínas que distingue a los animales y no está presente en vegetales y bacterias. De manera curiosa, representantes de esta familia de proteínas se encuentran en sistema nervioso de artrópodos (Adams, 1978). No hay ningún Phylum sin colágena, y es la proteína más abundante en los tejidos animales (Rossert & de Crombrughe, 1994).

La colágena tipo I (figura 3a) forma cadenas basadas en trómeros de cadenas alfa\*. Una característica de la colágena tipo I es la presencia del aminoácido hidroxiprolina -ácido 4-hidroxi-2-pirrolidincarboxílico- (Pauling, 1988), el cual no puede formar puentes de

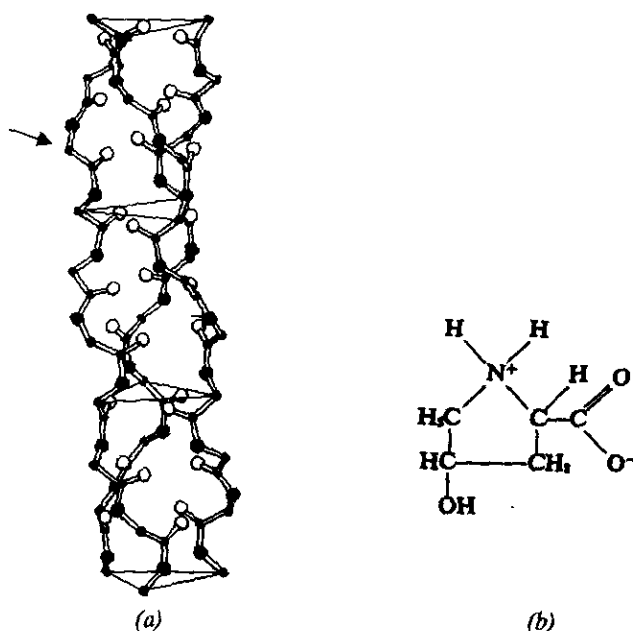


Fig.3. (a) Modelo de colágena tipo I (Pauling & Corey, 1951). Las esferas más pequeñas de color negro representan átomos de carbón del esqueleto de los aminoácidos (un átomo de carbón  $\alpha$  es indicado por una flecha. Los residuos asociados a los carbonos  $\alpha$  no se representan en la figura) y las esferas más claras son oxigenos del carboxilo del aminoácido y las esferas negras más grandes son los nitrógenos. (b) Hidroxiprolina distintiva de la colágena tipo I. El OH en el cuarto carbón o quinto carbón lo diferencia de la prolina (Tomado de Pauling, 1988).

\* En la nomenclatura de este tipo de proteínas, se ha encontrado que la mayoría de los autores mencionan "cadenas alfa", cuando por lo menos un autor dice que son hélices alfa (Parsche & Nerlich, 1997).

hidrógeno (ver figura 3b), deformando en secciones, la cadena alfa (Morrison & Boyd, 1976). Según autores, este aminoácido es responsable de tal conformación estructural, sin conocerse del todo hasta ahora de qué forma interviene la simetría de este aminoácido en la estabilidad y conformación terciaria y cuaternaria de esta macromolécula (Rossert, & de Crombrughe, 1996).

La fibra de colágena se forma a partir de cadenas triple hélice de procolágena que al asociarse, mediante puentes de agua y enlaces covalentes intra- e intercadena, con otras, se les denomina tropocolágena y de esta forma se crea la fibra de colágena.

De la fase orgánica ósea, entre el 90-95% es colágena tipo I, y el resto son otros tipos de colágenas, proteoglucanos, glucoproteínas, sialoproteínas, proteínas séricas y fosfolípidos.

Al parecer la calcificación de hueso se inicia entre sus oquedades, y existen varios modelos para su explicación (Woodhead-Galloway, 1980). Algunos estudios, entre los que figuran los análisis por difracción de neutrones (Viidik, & Vuust, 1980.), han determinado que el crecimiento de la fase cristalina en las oquedades se inicia en la región amino-terminal de la colágena I.

Los espacios entre los sitios terminales de la tropocolágena, en una fibra de colágena, son los centros de nucleación (ver figura 4) para el depósito y formación del fosfato de calcio, y posteriormente carbonato de hidroxapatita, en la formación de hueso (Hames, *et al.* 1997).

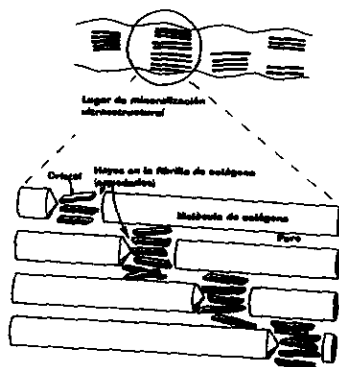


Fig. 4. Regiones donde se depositan los cristales de carbonato de hidroxapatita (CHAP) en la molécula de colágena I en tejido óseo (tomado de Carter, 1990).

Los estudios hechos para dilucidar los procesos de calcificación (Brès, E.F. 1992, Carter, 1990, Combes, *et al.* 1999) hacen sólo referencia a los cambios en las fases cristalinas que preceden a la formación de hueso, escudriñando las distintas facetas que llevan a la formación del carbonato de hidroxapatita, sin bases experimentales sólidas.

El papel desempeñado por las fibras de colágeno en el fenómeno de nucleación, es una piedra angular, pues sin esta proteína simplemente no hay nucleación. Sin embargo experimentalmente, es decir, *in vitro* se han podido asociar al proceso de nucleación de carbonato de hidroxapatita, otras proteínas como la albúmina sérica. En el caso de esta última proteína, se ha determinado experimentalmente que su efecto calcificador depende de su concentración, y sería entonces consecuente pensar que puede estar relacionada con la calcificación primaria de tejidos que originalmente no deberían estar calcificados, tal como vasos sanguíneos y otros (Combes, 1999).

### 1.3. Fase mineral en hueso

Se acepta que la fase mineral del hueso esta compuesta por microcristales, no estequiométricos de la hidroxapatita (HAp), con una deficiencia de calcio de entre el 5 y 10 % y notorias cantidades de iones carbonato, con respecto de otros tejidos calcificados como los dientes (un valor dado es 7.4% en LeGeros-Zapanta, R.1994).

#### 1.3.1. Estructura de la Hidroxapatita (HAp) sintética

La estructura de la hidroxapatita sintética, con fórmula química  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ , pertenece al sistema cristalino hexagonal y su simetría es descrita por el grupo espacial  $P6_3/m$ . Su celda unidad tiene los parámetros  $a=9.418\text{\AA}$  y  $c=6.884\text{\AA}$  y posee 2 fórmulas químicas en cada celda unidad. Tiene dos tipos de calcio: Ca(1) y Ca(2), que se diferencian entre sí por sus números de coordinación (n.c.), que son 9 y 7 respectivamente.

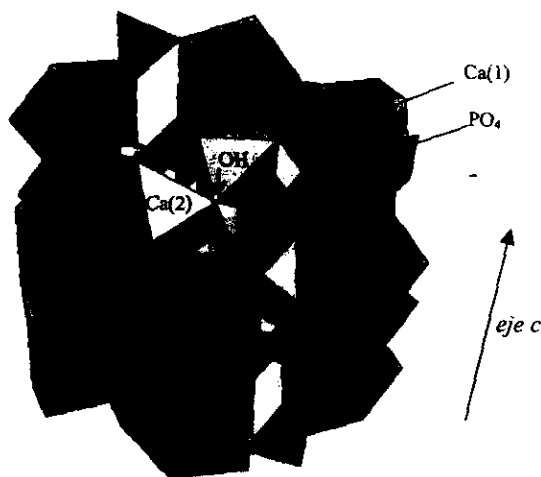


Fig. 5. Modelo de la estructura de la hidroxapatita sintética, con fórmula química  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ .

Los calcios tipo 1 se apilan unos a otros en dirección del eje *c* de la celda unidad hexagonal (los poliedros de coordinación de mayor tamaño en la fig. 5 e indicados como Ca(1)) y cada una de estas pilas o columnas se unen entre sí mediante grupos fosfato (tetraédricos) que les confieren rigidez. En la estructura hexagonal (fig. 5) los calcios tipo 2 se encuentran rodeados por los calcios tipo 1 (los poliedros de coordinación de tamaño medio), donde los tres calcios de tipo 2 también se relacionan en grupos de tres, de forma concéntrica y en su parte central hay iones OH<sup>-</sup> (ver fig. 5) (Vaughan, 1970, Merry, *et al.* 1998, Zapanta-LeGeros, 1965, Heredia, *et al.* 1998).

### 1.3.2. Morfología de la fase mineral

El tamaño y forma del cristal varía entre especies, así como con la edad, tipo de hueso, enfermedades y dietas, por ser un tejido dinámico en homeostásis con todo el organismo. Algunos análisis experimentales indican que la HAp se vuelve más estequiométrica entre mayor cantidad de cristal se asocie, del mismo modo que hay un aumento de tamaño en los cristales.



Fig. 6. Esta micrografía muestra las distintas formas adoptadas por los cristales al variar las cantidades (%) de carbonatos presentes en los cristales de hidroxiapatita sintética (%CO<sub>3</sub> en A=0.5, B=12.8 Tomado de LeGeros, 1994).

Se ha encontrado experimentalmente (LeGeros, 1994), que la fase mineral del hueso, puede, contener dos tipos de microcristales:

1. En forma de aguja y
2. En forma de hojuela (aunque las opiniones acerca de la morfología están muy divididas, ver tabla 1 y fig.6).

El tipo 1, de acuerdo la concentración de ion carbonato en hueso, es al parecer el que se encuentra presente en este tejido, sin haber evidencias experimentales fuertes que sustenten esta idea (LeGeros, 1994).

El tipo 2 se encuentra en hueso al remover la matriz orgánica y ambos se encuentran en preparaciones anhidricas para microscopía electrónica de transmisión. Se dice, también, que la forma y tamaño de los cristales no varía significativamente al mineralizarse el tejido. De esta forma, en el ser humano adulto, los cristales miden de 25-30 nm × 2.5-5 nm, aunque este dato puede variar entre autores (Carter, 1990 y ver tabla 1).

Tabla 1.  
Relación de dimensiones y formas para los microcristales de hidroxiapatita.

Dimensiones (en nanómetros)	Forma	Origen	Tomado de
50×25×10	Aguja	Biológico	Ham, A.W. 1953.
40×10×1-3	Aguja	Biológico	Guyton, A.C. 1989.
20-40×1.53	Placa	Biológico	Bu Park, J. 1984.
50×28×2	Placa	Biológico	Bartsiokas, A. & Middleton, A.P. 1992
7*Ø× 20-100	Aguja	Biológico	Heaney, R.P. 1996.
89×50×150	Placa	Biológico**	Bres, E.F. 1992.

\*Ø = diámetro

\*\*= sólo en este caso los datos se refieren al microcristal de cHAp del esmalte dental, y los demás datos, pertenecen a mineral óseo.

Actualmente no se sabe cómo se relacionan las fases que componen al tejido óseo y es reciente el estudio de sus formas de interacción (Francillon-Vieillot, *et al.* 1990). Sin embargo, análisis recientes determinan que fenómenos como la osteoinducción, está relacionada con las características morfológicas de la fase inorgánica (es decir, la forma de los cristalitas de carbonato de hidroxiapatita).

#### **1.4. Iones y fases inorgánicas presentes en hueso**

Los iones presentes en hueso son: calcio, iones fosfato derivados del ácido fosfórico (ortofosfatos), iones inorgánicos (asociados a sodio, magnesio, estroncio), carbonatos, citratos, fluoruros, sílice, manganeso y bario. Para muchos iones mencionados, su ubicación no es exclusiva del hueso, sino también de los dientes. El hueso contiene cerca del 50% del sodio y 65% del magnesio corporal (en promedio un adulto de 70 kg, tendría cerca de 63 gramos de Na<sup>+</sup> y 21 gramos de Mg<sup>2+</sup> totales). La distribución de estos iones varía no sólo por regiones corporales, edades, tipos de nutrición, patologías, etc, sino también por tipos celulares relacionados a hueso, pues estos iones actúan como catalizadores de ciertas reacciones enzimáticas, pero su concentración en líquido extracelular estaría entre 1.8 y 2.5 mEq/ L para el Mg<sup>2+</sup> y 142 mEq/L para el Sodio. En el tejido óseo se encontrarían distribuidos en la fase inorgánica, es decir, en la fase mineral (Guyton, 1989). Los cálculos hechos a partir de los datos de concentraciones para Mg<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup>, con el fin de obtener estos mismos valores para hueso, dan como resultado 0.175 miligramos de Mg<sup>2+</sup> por cada gramo de hueso y 1.1776 miligramos de Na<sup>+</sup> por cada gramo de hueso. Como en cualquier mineral, los iones que sustituyen a los iones originales en hueso, producen cambios en la estructura cristalina. Por ejemplo, si un ion flúor sustituye al grupo OH<sup>-</sup> en la hidroxiapatita (ver tabla 2), ahora se le denominará fluorapatita, si se usa

cloro en lugar de flúor, entonces es cloroapatita y así sucesivamente (Lacout, & Taitai, 1994, LeGeros, 1994).

La forma en que los iones se incorporan a la fase inorgánica del hueso es hasta ahora poco conocida en detalle, pero se han encontrado datos como los siguientes (Vaughan, 1970):

Tabla 2.  
Iones propuestos en un modelo de sustitución para el cristal de la hidroxiapatita.  
(Cuadro tomado de Vaughan, 1970.)

Ubicación del ion en:

Capa de * hidratación	Superficie del cristal	Interior del cristal	Ion desplazado	
Ion	Sólo en agua			
K <sup>+</sup>	si	no	no	} Ca <sup>++</sup>
Na <sup>+</sup>	si	si	no	
Mg <sup>++</sup>	si	no	no	
UO <sub>2</sub> <sup>++</sup>	si	no	si	
Sr <sup>++</sup>	si	si	si	
Ra <sup>++</sup>	si	si	si	
Cl <sup>+</sup>	si	no	no	Ninguno
Citrato <sup>3-</sup>	si	no	no	} PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	si	si	no	
F <sup>-</sup>	si	si	si	OH <sup>-</sup>

\* Según este modelo de sustitución iónica, el microcristal de hidroxiapatita posee ciertos niveles de interacción con el medio circundante, lo cual indicaría que hay sitios estructurales donde sería imposible extraer iones para plasma. El autor (Vaughan, 1970) determina que estas son las denominaciones para esas regiones: Capa de hidratación, superficie del cristal e interior del cristal. (Cuadro tomado de Vaughan, 1970.)

Los iones procedentes del tejido óseo, como debe suponerse, son muy variados en tipos y concentraciones para poder mantener la homeostasis del organismo, la cual se basa en sistemas de retroalimentación, que lo equilibran con respecto al entorno, mediante hormonas (Guyton, 1989).

Las fases presentes en hueso no sólo pueden diferenciarse por su origen orgánico o inorgánico, sino por la disposición de su estructura interna, como es el caso de los amorfos, sean estos orgánicos o inorgánicos.

Las evidencias actuales que determinan las relaciones entre la fase orgánica (especialmente colágena I) y la inorgánica (amorfa y cristalina) son los enlaces fosforilados de una de las cadenas de la colágena (en el aminoácido glutamina en forma de  $\gamma$ -glutamil fosfato) que podría traer como consecuencia asociación con algunas fases inorgánicas (Eyre, 1996). Las fases inorgánicas presentes en hueso son aún poco conocidas, pero se establece que son principalmente:

El fosfato dicálcico ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ), el fosfato dibásico de calcio ( $\text{CaHPO}_4$ ), el fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) (Rivera, 1997) y el fosfato monohidrogenado ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) (Ozin, *et al.* 1997). Algunos autores (Combes, *et al.* 1999) han propuesto la existencia del fosfato octocálcico ( $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), por ser muy semejante, en estructura, a la hidroxiapatita en hueso, pero los análisis de difracción de rayos X no lo han registrado, tal vez por ser una estructura no totalmente cristalina o totalmente amorfa (Combes, *et al.* 1999). Otros autores (Curry, *et al.* 1971) comentan que el fosfato de calcio ( $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_3$ ) amorfo es precursor de la biomineralización, junto (o alternativamente) a la brushita ( $\text{CaH}_2\text{P}_2\text{O}_6$ ) (Curry, *et al.* 1971) aragonita ( $\text{CaCO}_3$ ) y wtiloquita ( $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). Las propuestas van encaminadas a relacionar los fosfatos de calcio con la biomineralización ósea.

#### *Propuestas de sustitución de iones en la estructura de la hidroxiapatita.*

Los parámetros de interés para examinar el problema de las sustituciones iónicas son generalmente: las valencias, radios iónicos, números de coordinación y simetría puntual del elemento o grupo funcional (ver tabla 2 y 3).

En general, la bibliografía indica que los iones foráneos (ver tabla 2), en la HAp, sustituyen a los iones  $\text{OH}^-$  o a los  $\text{PO}_4^{3-}$ , en la estructura del carbonato de hidroxiapatita, cambiando las propiedades de este material (LeGeros, 1994, Vaughan, 1970, Bu Park, 1984). Son pocos los autores que comentan la forma en que se balancean las cargas al haber el intercambio iónico, que aleja de la estequiometría al cHAp. Las dos formas consideradas, de balance de cargas, tendrían dos mecanismos de acción dependiendo de la movilización de los iones al integrarse un ion carbonato a la estructura de la hidroxiapatita:

1. De inclusión de iones (LeGeros, 1994, Vaughan, 1970, Bu Park, 1984). En este caso, los iones incorporados son los mismos que aparecen en la tabla 2 y son sumamente discutidos por los autores (LeGeros, 1994, Curry, *et al.* 1971) debido a sus cargas y radios iónicos, pues podrían sustituirse en la estructura por su radio iónico pero no por su carga, o viceversa, o simplemente no ser un ion común en la naturaleza, pero por sus características químicas sí podría ser un ion sustituible.
2. De exclusión de iones (Bres, 1992). En este otro caso, se considera que al introducirse un ion carbonato deben ser sustituidos 2 iones  $\text{OH}^-$  y por otro lado al incluir un ion carbonato, éste sustituye a un  $\text{PO}_4^{3-}$  y el balance de cargas sería acompañado por la pérdida conjunta de un  $\text{Ca}^{2+}$  y de un  $\text{OH}^-$ . El carbonato se metería en la estructura del cristal y no en las superficies (Bres, 1992).

Tabla 3. Números de coordinación y Radios iónicos de iones presentes en tejido óseo .

Ion	N.C. (número de coordinación)	Radio iónico (Å)*
Ca <sup>2+</sup>	7	1.06
Ca <sup>2+</sup>	9	1.18
Na <sup>+</sup>	7	1.12
Na <sup>+</sup>	9	1.24
K <sup>+</sup>	7	1.46
K <sup>+</sup>	9	1.55

(Valores tomados de Giocovazzo, *et al.* 1995)

\*Para estos iones se incluyen solamente los radios iónicos más parecidos a los determinados en la estructura del carbonato de hidroxapatita (cHAp), lo cual no quiere decir que son los únicos posibles, pero al determinar el intercambio iónico, los tamaños se consideraron limitantes a estas sustituciones, lo que quiere decir que para considerar alguna sustitución se pretendió hacerla con iones de la misma carga y de tamaños semejantes.

### 1.5. Propiedades físicas, químicas y biológicas del hueso

El hueso tiene la capacidad de transformarse por cambios en su entorno y, en ciencia de materiales es considerado un *composite*, lo cual significa que es un material polimérico reforzado con una o más fases orgánicas o inorgánicas (Ashby, & Jones, 1993). Las estructuras óseas están diseñadas para cumplir ciertas funciones (huesos largos, cortos, con articulaciones móviles, etc.), lo cual hace una diferencia macroscópica en los mismos huesos.

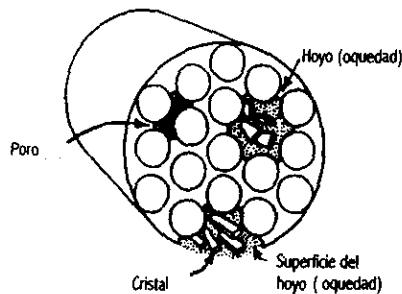


Figura 7. Modelo de Fibrilla de colágena. Corte transversal mostrando las posibles zonas de nucleación, (Tomado de Carter, 1990)

Los patrones físicos del material óseo son moldeables (hasta cierto punto) con respecto a tensiones del medio. En el caso de su estructura celular, se ha mencionado que tiene patrones fractales, lo cual podría reflejarse en un comportamiento no lineal (del tejido óseo con respecto al medio) debido a los cambios en el entorno (Majumdar, *et al.* 1993). El conocer algunas de las características del hueso y su compleja estructura, como tejido, nos lleva a reflexionar sobre sus propiedades mecánicas, y por lo tanto como un biomaterial.

Los materiales composites son materiales multicomponentes, generalmente compuestos de fibras reforzadas o mezclas de cerámicas y polímeros con propiedades biológicas (fig.7). Las propiedades de los materiales composites pueden ser muy variadas, pero de forma general se pueden enunciar tres:

1. Contienen dos o más fases distintas pero estrechamente relacionadas. Estas pueden ser continuas o discontinuas.
2. Cada una de estas fases están relacionadas por mecanismos de adhesión en la interfase de una o más fases
3. Las propiedades del material composite son distintas de los materiales que componen cada fase.

(Ozin, *et al.* 1997)

El conocimiento de los componentes totales del tejido óseo, es importante desde la perspectiva de la toxicología médica, para poder sintetizar un material lo más parecido al tejido óseo y que no genere rechazo al implantarse. Al hablar de materiales para restitución de partes óseas, estamos indirectamente hablando de la sustitución mecánica, sin olvidar la porción correspondiente a la fisiología.

Uno de los motivos del estudio de la mecánica ósea es entender los riesgos a los que está sometido por sus características arquitectónicas. Estas han sido estudiadas desde hace largo tiempo, por ejemplo Galileo determinó que el hueso es directamente influenciado por tensiones mecánicas debido a sus funciones normales. Como un material, el hueso es considerado como anisotrópico, no lineal, y viscoelástico.

Como cualquier objeto en la naturaleza, el hueso padece deformaciones cuando se le aplica una fuerza. Si el hueso se constriñe, sin poder moverse o si fuerzas iguales se le aplican, ocurren deformaciones, produciendo una resistencia interna a la fuerza aplicada. La resistencia interna es conocida como esfuerzo el cual se define:

$$\text{Esfuerzo} = \text{Fuerza} / \text{Area.} \quad (1)$$

Desde el punto de vista estructural los tipos de esfuerzos a los que puede estar sometido un hueso, se pueden clasificar en tres tipos: tensión, compresión y corte.

Tabla 4. Principales valores para hueso humano como material (Tomado de Einhorn, T. A. 1996)

Hueso	Dirección y tipo de carga	Densidad aparente (g/cm <sup>3</sup> )	Modulo de elasticidad (10 <sup>6</sup> MPa)
Fémur medio, corteza	Tensión longitudinal	1.85	17,000
	Compresión longitudinal	1.85	17,000
	Corte longitudinal	1.85	3,000
	Tensión Transversa	1.85	11,500
	compresión transversa	1.85	11,500
Trabécula de cuerpo Vertebral	Compresión	0.31	76

El hueso tiene toda esta variedad de propiedades mecánicas debido a la diversidad de conformaciones del *composite* óseo. De esta forma, tenemos que la fase mineral contribuye a la resistencia a tensiones y compresiones, dependiendo del tipo de hueso, la viscoelasticidad corresponde a la matriz orgánica. La relación entre geometría estructural, composición ósea y propiedades bioquímicas ilustran las importantes interacciones entre forma y función. La forma en que los factores bioquímicos (hormonales) afectan las propiedades de este material son debidas a cambios metabólicos. Los cambios en el módulo de elasticidad o en la resistencia a fuerzas extremas es a través del cambio en el tamaño de cristales, imperfecciones en los cristales y remodelaje óseo. Para que exista un remodelaje óseo relacionado con los cambios mecánicos, se debe presumir que hay líneas celulares encargadas de este trabajo, sólo que hasta ahora no hay mas que dos candidatos; las células del revestimiento (de origen osteoblástico) y osteocitos, inclinándose hacia estos últimos como mecanotransductores (Einhorn, 1996).

La forma de ver las estructuras biológicas calcificadas, varía con la división de las propiedades de los materiales que estas estructuras contienen, pero el entender estas estructuras por separado no garantiza entender la estructura original o completa.

Para el caso del hueso, el entendimiento de sus propiedades radica en conocer las interacciones entre las estructuras subcelulares, como los cristales y las proteínas estructurales. Por ejemplo, en estructuras óseas, las hojuelas o agujas de carbonato de hidroxapatita, es decir, los microcristales con estas formas, se deben formar y disponer según el ambiente mecánico actuante sobre el hueso, de esta forma se modificarían sus propiedades mecánicas de este tejido (Currey, 1990).

## 1.6. Modelos estructurales propuestos en la literatura para el carbonato de hidroxiapatita

### 1.6.1. Carbonato de Hidroxiapatita

La presencia de iones carbonato sustituyendo a los iones fosfato (Merry, *et al.* 1998) y su descomposición, no está establecida biológicamente, sino exclusivamente para materiales sintetizados *in vitro*. En este tipo de análisis se encuentra que la relación estequiométrica puede variar de acuerdo al medio circundante, en que el  $\text{CO}_2$  se incorpora a las muestras en forma de carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) y donde la apatita ósea debe estar baja en estos iones (Fernández, *et al.* 1998.), pues es deficiente en ellos de manera natural (el contenido de estos es algo que define a la HAp ósea) y la apatita procedente del hueso no es estequiométrica.

### 1.6.2. Características estructurales del ion Carbonato

Una de las incógnitas del mineral óseo se refiere a la ubicación del ion carbonato en la celda unidad del carbonato de hidroxiapatita (cHAp). La importancia de este ion radica en que algunas propiedades como la reabsorción y la dureza mecánica dependen de su posición en el cristal, así como de su concentración en él (Zapanta-LeGeros, R. 1965). Aunque en el caso del esmalte dental, parece que las características de dureza corresponden al acomodo de los cristalitas en la superficie del diente, donde al estar más ordenados y más perpendiculares a la superficie, su dureza es mayor. Lo mismo podría ocurrir en la superficie del hueso (Cevc, *et al.* 1980).

El átomo de carbono forma enlaces covalentes y su radio covalente es  $0.77\text{Å}$  (Pauling, 1988). Por otro lado, el ácido carbónico y sus derivados tienen tres estructuras de resonancia (Ver A, B y C de la figura 8) siendo esta resonancia completa para el ion y algo inhibida en el ácido y sus ésteres. La estructura resonante requiere que el ion carbonato sea plano, con ángulos de unión de  $120^\circ$  y tres distancias  $\text{C} = \text{O}$  iguales a  $1.32\text{Å}$ . La configuración trigonal plana del ion fue hallada en el estudio original, por rayos X, de la calcita y desde entonces ha sido verificado examinando otros carbonatos cristalinos (Pauling, L. 1965).

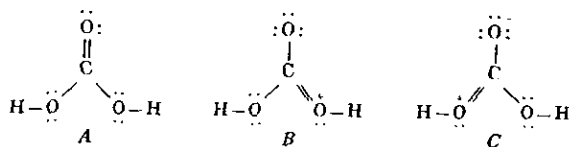


Fig. 8. Este esquema representa la resonancia de los electrones en el ion carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ). Para este ion se ha establecido una estructura plana (tomado de Pauling, 1965).

### **1.7. Hueso antiguo**

El estudio del material óseo antiguo se practica comúnmente por los antropólogos, arqueólogos, paleontólogos, etc., con el fin de reconstruir el pasado de algún organismo, su ubicación en el tiempo y su relación con el medio. Desde esta visión se pueden conocer los padecimientos que este organismo tuvo en vida, por la composición de elementos presentes en el tejido óseo; esto sería un acercamiento a la ecología de poblaciones. El hueso antiguo pasa por procesos de carácter inorgánico que le confieren cambios, y estos, en algún momento pueden ser útiles para implementar una técnica de fechamiento.

Importan, entonces, los procesos que le pueden afectar, cuando ya no se encuentra bajo la fisiología del organismo. Los tres tipos principales de procesos que afectan al hueso antiguo son según Piepenbrink (1989) :

1. Solvatación y sustitución homoiónica o heteroiónica en la red cristalina. No necesariamente afecta la integridad de la microestructura del hueso.
2. Disolución de la hidroxiapatita y recristalización isomórfica y/o heteromórfica. Este tipo de descomposición química está relacionada con los valores de pH del medio. Este cambio, en ocasiones, conlleva cambios en la estructura cristalina.
3. Descomposición heteroiónica y heteromórfica. En este proceso se cambia la estructura original debido a cambios en los iones sustituyentes.

Para la datación, la obtención de cronologías reviste una trascendental importancia en el conocimiento histórico de eventos y, es en este contexto, donde el estudio de huesos puede proporcionar una metodología para fechamiento (Vento, *et al* 1981).

#### **1.7.1. Fechamiento por Colágeno\* Residual**

El hecho de que la colágena ósea se elimine a tasas posiblemente constantes hace pensar que para un lugar determinado se pueda relacionar la fecha de muerte de un organismo con la cantidad de colágeno presente al momento de su estudio. Esta técnica es sumamente rápida y muy económica, y aunque es destructiva, su funcionamiento está aun bajo estudio. La forma en que opera es relacionando antigüedades conocidas de organismos de una misma región (con las condiciones de enterramiento lo más semejante posibles) con la pérdida de la masa del material orgánico del hueso por medio de combustión de la muestra de tejido óseo. Los valores obtenidos sólo son válidos para esa localidad. Esta técnica tiene origen en el fechamiento óseo en los países del este de Europa (Vento, *et al*. 1981). La técnica requiere de una previa calibración que no se tiene en la mayoría de los lugares.

\*La gente que ocupa esta técnica se refiere a la colágena como "colágeno", en masculino, aunque la nomenclatura castellana para las macromoléculas sea siempre en términos femeninos. Nosotros la tomamos como sinónimos

## 2. TÉCNICAS PROPUESTAS PARA EL ANÁLISIS DE MATERIAL ÓSEO

### 2.1. Difracción de rayos X

El uso de la técnica de difracción de rayos X, en el estudio de minerales es de suma importancia, inclusive para la biología, no sólo desde la visión de identificación de materiales minerales en los organismos (siempre y cuando sean cristalinos), sino por el análisis de estructuras que es posible determinar (es decir, la ubicación de todos los átomos en el espacio). Esta técnica se aplica en sustancias que se pueden cristalizar, por ejemplo el caso de muchas proteínas. La difracción de rayos X en material poco ordenado o no cristalino tiene apenas un desarrollo incipiente.

El estudio de proteínas se ha llevado a cabo gracias a las técnicas de crecimiento de cristales, pero en la naturaleza, las proteínas no se encuentran en este estado, es decir, cristalinas (su cristalización es una tarea realmente difícil y en ocasiones imposible).

Los datos obtenidos por difracción de rayos X de las proteínas permiten la obtención de sus parámetros estructurales. Como un ejemplo más, de aplicación de la técnica de rayos X, tenemos en el estudio de los virus. El estudio de las estructuras de los virus se ha fundamentado, en general, en patrones de difracción de rayos X de monocristales (Ryzhkov, 1956).

Los rayos X se producen al bombardear un metal con electrones de alta energía. Cuando los electrones penetran en el metal se desaceleran y emiten radiación en un intervalo de longitudes de onda. Ésta radiación es continua y sobre este continuo aparecen sobrepuestos unos cuantos picos agudos de alta intensidad. Estos picos tienen origen en la interacción de los electrones incidentes con los electrones de las capas internas de los átomos: una colisión expulsa un electrón y un electrón de mayor energía desciende a la vacante, emitiendo el exceso de energía como un fotón de rayos X. Estos rayos se llaman "característicos", por que su energía y longitud de onda, dependen del elemento que los origina.

#### *El fenómeno de difracción y la ley de Bragg*

En general, la difracción es un fenómeno que se presenta cuando las ondas (de cualquier tipo) de un haz incidente interfieren entre sí después de haber sido dispersadas por un arreglo de objetos (moléculas y/o átomos) que se encuentran a su paso y que presentan un arreglo periódico tridimensional.

Esto es, la onda viaja en el medio, y al encontrarse con un obstáculo, la onda se dispersa en distintas direcciones, posteriormente a la dispersión por los obstáculos, las ondas interfieren. La interferencia constructiva de estas ondas se expresa matemáticamente

por medio de la ley de Bragg.

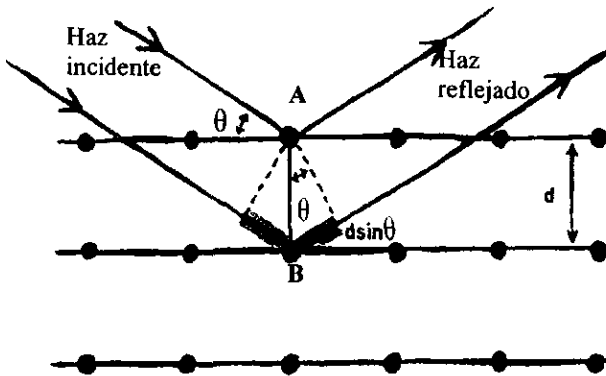


Fig. 9. Esta imagen representa el fenómeno de difracción y las reflexiones a ángulos específicos de  $2\theta$ . El valor de  $2\theta$  es el ángulo entre del haz incidente y el haz detectado.

En la fig. 9 se pueden observar 2 haces que inciden en 2 centros dispersores distintos (A y B), entonces tenemos que el dispersado por B lleva un recorrido extra definido en la figura por el doble de  $d \sin \theta$ . Para que los dos haces estuvieran en fase, se requeriría que el recorrido extra, del haz dispersado en B, fuera igual a un número entero ( $n$ ) de longitudes de onda ( $\lambda$ ); esta es justamente la condición de Bragg. La obtención de esta fórmula es una construcción geométrica, en la cual se obtiene:

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

La técnica de difracción de rayos X ocupada por nosotros fue la de polvos, donde, a diferencia de los materiales en forma de monocristal, tenemos muchos cristalitos, es decir, polvo policristalino. Este material, al colocarlo en un portamuestras, idealmente queda arreglado al azar, consiguiendo que el haz de rayos X llegue a la muestra incidiendo en todas las disposiciones de las caras de los cristalitos. En muchos casos, es posible obtener de esta manera la suficiente información para determinar la estructura cristalina de la muestra de interés. Esta técnica ofrece la ventaja de que se pueden analizar muestras que no son monocristales. Para aplicar los métodos directos de determinación de estructuras cristalinas, el cristalito debe tener cuando menos unos cuantos milímetros en sus dimensiones. Lo anterior tiene un significado muy importante en Biología, pues los materiales biológicos están o bien en estado amorfo o bien, en estado policristalino (dientes, conchas, pelo, escamas, etc, son ejemplos de materiales biológicos amorfos y/o en forma de polvo).

Los difractogramas obtenidos a partir de un material policristalino son gráficas de ángulos  $2\theta$  ( $^\circ$ ) versus intensidad (cuentas), donde  $2\theta^\circ$  es el ángulo entre el haz incidente y el haz difractado (ver figura 9, ley de Bragg).

La importancia del análisis mediante la difracción de rayos X en este trabajo, radica en poder estudiar y/o determinar el arreglo de los átomos en la estructura de los cristallitos del hueso, pues estos son la estructura básica de la fase mineral del tejido óseo. La forma de obtener esta estructura es a partir del análisis de la intensidad en la gráfica de  $2\theta^\circ$  vs. la Intensidad. Esos máximos de intensidad ocurren cuando se cumple la condición de Bragg, (para los planos de átomos con índices h, k, l. Con respecto estos planos ver apéndice 1) de la red cristalina, y es a partir de los ángulos  $2\theta^\circ$  que se pueden obtener las distancias entre planos y sus submúltiplos enteros por medio de la ley de Bragg (Fig.9). La intensidad está dada por:

$$I_{hkl} \propto |F_{hkl}|^2 \quad (3)$$

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^N f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (4)$$

donde  $F_{hkl}$  es el llamado factor de estructura del cristal,  $N$  es el número total de átomos en la celda unidad, y  $f_j$ ,  $x_j$ ,  $y_j$ ,  $z_j$  son el factor de dispersión y las coordenadas cristalográficas del átomo  $j$ .

#### *Metodo Rietveld.*

El método de Rietveld es un método de ajuste por el método de mínimos cuadrados de un patrón de difracción calculado con un patrón de difracción obtenido experimentalmente. El método fue propuesto originalmente por Rietveld para datos de difracción de neutrones y, posteriormente se implementó con mucho éxito en el análisis de datos de difracción de rayos X. El ajuste por mínimos cuadrados usados en la metodología Rietveld se basó en la minimización de la siguiente expresión:

$$S = \sum_{i=1}^N w (y_i^{obs} - y_i^{calc})^2 \quad (5)$$

donde  $y_i^{obs}$  son las cuentas graficadas en el eje vertical del patrón de difracción obtenido experimentalmente en función del ángulo  $2\theta$  y  $y_i^{calc}$  es el valor calculado de ese mismo número de cuentas, en función de  $2\theta$  de acuerdo con la siguiente fórmula

$$y_i^{calc} = S \sum_{hkl} m_{hkl} LP_{hkl} |F_{hkl}|^2 \Omega(2\theta_i - 2\theta_{hkl}) + B_i \quad (6)$$

donde  $S$  es el factor de escala,  $m_{hkl}$  el factor de multiplicidad de los planos  $hkl$ ,  $LP_{hkl}$  el factor de Lorentz y polarización,  $F_{hkl}$  el factor de estructura,  $\Omega$  la función que describe los

contornos de las reflexiones y  $B_i$  es el término que describe el fondo del patrón de difracción. El método de Rietveld original incluye el ajuste de parámetros estructurales de un modelo propuesto como son: coordenadas cristalográficas, factores de temperatura, y factores de ocupación.

El orden que se sigue para efectuar el refinamiento de los parámetros estructurales es

1. Coordenadas cristalográficas. Generalmente se empieza con los átomos más pesados, dejando al último los átomos ligeros.
2. Parámetros de los momentos magnéticos (en el caso de estructuras magnéticas).
3. Factores de temperatura isotrópicos.
4. Factores de temperatura anisotrópicos. Si se refinan estos parámetros, los factores de temperatura isotrópicos correspondientes se dejan en cero.
5. Factores de ocupación. No se refinan si la fase es estequiométrica y no es una aleación o solución sólida (las concentraciones -en partes por millón- no se pueden detectar mediante el ajuste de los factores de ocupación).

#### *Análisis de materiales amorfos: la ecuación de Debye.*

El análisis estructural de proteínas, o de materiales orgánicos en general, es de suma importancia por sus implicaciones biológicas, en términos de biomedicina, evolución y farmacología. Las estructuras biológicas especialmente se caracterizan por estar en estado amorfo, y las expresiones analíticas que se ocupan para su análisis son bastante distintas a las ocupadas en materiales ordenados, es decir, cristalinos. A principios de siglo, Peter Debye formuló la ecuación que lleva su nombre, donde se asume que los átomos están agrupados en la muestra de forma homogénea y estadísticamente isotrópica (como ocurre en un gas, casi todos los líquidos y en muestras de cristales muy pequeños y dispersados) con grupos idénticos de átomos, de geometría conocida y orientación azarosa. La ecuación de Debye es:

$$I_{\text{amorfo}} = \sum_{i,j} f_i f_j \frac{\text{sen}(Qr_{ij})}{Qr_{ij}} \quad (7)$$

donde  $Q = 4\pi\text{sen}\theta/\lambda$ ,  $\theta$  es el ángulo de Bragg. La suma anterior es sobre todas las parejas de átomos  $i$  y  $j$  separados una distancia  $r_{ij}$ , con factores de dispersión  $f_i$  y  $f_j$ , que constituyen todo el volumen del material amorfo que difracta.

En el método de Rietveld, la ecuación de Debye se trunca ocupando los 6 términos más importantes, que son de la forma:

$$B_{ci} \text{sen}Qd_i/Qd_i \quad (8)$$

donde  $d_i$  la distancia entre dos átomos y  $B_{ci}$  es proporcional al producto de los factores de dispersión de cada átomo ( $f_i$  y  $f_j$ ) y al número de veces en que esta pareja, y distancia interatómica, aparece en el volumen del amorfo que dispersa los rayos X. Los parámetros  $B_{ci}$  y  $d_i$  se tienen que añadir en el proceso de minimización por mínimos cuadrados. De esta forma, del ajuste de estos parámetros, para un material amorfo dado (en nuestro caso colágena) es posible extraer los parámetros estructurales más comunes, que le corresponden para definir su estructura, es decir, las distancias interatómicas más frecuentes ( $d_i$ ).

## 2.2. Tratamientos químicos

El uso de sustancias químicas como posibles “extractores” de sustancias orgánicas, en material óseo, resultan útiles por no ser necesario el incremento de la temperatura.

En nuestro caso, se sabe que la colágena es demasiado estable no sólo a los cambios de temperatura (temperaturas asociadas al medio fisiológico), sino también a los cambios del medio químico (Holmgren, S.E., *et al.*1998).

Está reportado que la estabilidad de la colágena tipo I es alta en muchos tipos de soluciones en las que se encuentre (Ver 1.1. Microestructura ósea), y no es la excepción el caso del NaClO (hasta 24 horas) y HCl, reactivos ocupados por nosotros con el fin de extraer la colágena del hueso.

## 2.3. Tratamientos térmicos

El análisis térmico consiste en examinar el cambio en las propiedades físicas o químicas de una muestra en función de la temperatura. Las propiedades más comunes son:

1. Determinar los cambios de temperatura en las muestras con respecto a una muestra de referencia, asociando estas a transiciones de fase o a reacciones que surgen en la muestra para ciertos valores de temperatura (Análisis térmico diferencial),
2. Cambios en el peso a temperaturas determinadas (Análisis termogravimétrico) y,
3. Detección de cambios en el calor absorbido o emitido por la muestra (Calorimetría diferencial de barrido DSC).

El análisis térmico se usa comúnmente para materiales inorgánicos como minerales, alfarería, reacciones metálicas, etc. Aunque esto no quiere decir que no se pueda ocupar para materiales orgánicos como polímeros. Las propiedades de los materiales que se pueden medir son muy variados y contemplan la descomposición térmica de sólidos y líquidos, reacciones sólido- sólido y sólido- gas, así como identificación de fases, pureza y transiciones de fase, entre otras (DUPONT, 1987).

## 2.4. Técnicas nucleares. P.I.X.E. y R.B.S.

Las técnicas analíticas de origen nuclear han sido ampliamente utilizadas en la caracterización de la composición superficial de los materiales. En todos los casos el haz proviene de un acelerador de partículas, donde se pueden seleccionar estas, es decir se pueden acelerar protones, electrones, partículas alfa, iones, etc. De entre toda una gama de técnicas, destacan la Emisión de Rayos X Inducida por Partículas (P.I.X.E.), la Retrodispersión Elástica de Partículas –o Retrodispersión de Rutherford- (R.B.S.) y el Análisis por Detección de Retroceso Elástico (E.R.D.A.). Todas son técnicas de análisis multielemental y no destructivas. En el caso de P.I.X.E., el haz de iones, generalmente por

medio de una línea de vacío, se dirige hacia la muestra, de esta manera las partículas incidentes chocan con los átomos, expulsando electrones de las capas internas de este, ionizándolo. El átomo ionizado llenará las oquedades de los electrones expulsados con los electrones de las capas más externas, emitiéndose como consecuencia, rayos X y Gamma característicos para cada elemento. En el caso de R.B.S. se detectan las partículas que en un momento anterior chocaron con los átomos de la muestra. Los átomos se identifican debido a que las partículas incidentes tienen una misma energía y al producirse el choque con los núcleos de la muestra las partículas incidentes dejan en el núcleo una cantidad energética proporcional a la masa del átomo que la dispersó. Se usa especialmente para establecer la estequiometría del material ocupado (Ruvalcaba-Sil, 1998, Bucio, 1997).

Todas estas técnicas se pueden emplear simultáneamente, variando, exclusivamente, los detectores ocupados. Las resoluciones de los elementos detectados varían respecto a las intensidades de las partículas lanzadas, es decir, algunos elementos o grupos de elementos tendrán mejor resolución a partir de ciertas energías, como es el caso del Carbono, que a 1.8 MeV (protones) su resolución es poca, no así al aumentar a 4.4 MeV (partículas alfa), donde no sólo mejora la resolución del Carbono, sino también las del Fósforo y Calcio, elementos de suma importancia para nuestro análisis. En la técnica de E.R.D.A. a 3.0 MeV (núcleos de Helio) se detectan los elementos de tamaño más pequeño, es decir, el Hidrógeno y el Helio, para lo cual en este caso se tiene que "tamizar" el haz detectado con una placa, con el fin de detectar exclusivamente el Hidrógeno.

## 2.5. Microscopía Electrónica de Barrido (M.E.B)

El microscopio electrónico (M.E.) es una herramienta de gran importancia para estudios biológicos a nivel microestructural, aunque tiene origen, y es usado principalmente, en el estudio de materiales no biológicos. El hecho de que haya sido primeramente ocupado en ciencia de materiales, donde generalmente no se requiere de hacer preparaciones especiales, provocó un retraso en el análisis de materiales biológicos, en los cuales se tiene que hacer una preparación meticulosa, para que el haz de electrones no quemé la muestra o conduzca apropiadamente a los electrones y no se vean borrosidades, las cuales son producto de la mala conductividad electrónica del haz de electrones en las muestras biológicas (la conductividad electrónica puede aumentar si se depositan películas delgadas de algún material conductor, como grafito, oro, plata, etc). Lo anterior es debido a que el material biológico está constituido, generalmente, por átomos que forman enlaces covalentes (con electrones localizados) por lo que, no presentan gran capacidad para conducir los electrones que son utilizados para "iluminar" la muestra en el M.E.

La forma de conseguir una buena preparación es a base de fijadores que actúan con enzimas lisogénicas bloqueándolas para evitar la destrucción tisular, lo anterior con respecto a fijar y preservar el tejido. Para solucionar el problema de la baja densidad, a los electrones, se incubó el material biológico con un oxidante muy fuerte derivado de un metal pesado, generalmente tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ). Este reactivo, ocupado con una solución amortiguadora actúa también como fijador (Cárabez, 1998). Para el caso de los cortes en el microscopio electrónico se deben hacer de alrededor de 0.15  $\mu\text{m}$  de espesor, y si es de alta resolución entonces de 0.01 a 0.06  $\mu\text{m}$ , también de espesor.

## **2.6. Espectroscopías Raman e Infrarroja.**

El origen de las líneas espectrales en espectroscopía molecular es la emisión o absorción de un fotón cuando cambia la energía de una molécula. En espectroscopía de emisión una molécula experimenta una transición desde un estado más alto de energía a otro más bajo y emite la energía en exceso como un fotón de cierta frecuencia. Las espectroscopías de emisión y absorción proporcionan la misma información con respecto a las separaciones de niveles de energía, pero son razones prácticas las que determinan la técnica a ocupar.

La espectroscopía Raman explora los niveles de energía examinando las frecuencias presentes en la luz dispersada en lugar de la luz absorbida. Un rayo intenso de luz monocromática, por lo general en la región visible del espectro, incide sobre la muestra y la intensidad de la luz dispersada es observada en ángulo recto con respecto al rayo incidente. La mayor parte de la luz dispersada tiene la misma frecuencia que la luz incidente, pero una pequeña parte de la luz dispersada tiene frecuencias diferentes de la del rayo incidente. Las diferencias de energía entre las líneas débiles y la línea principal corresponderán a las transiciones vibracionales y/o rotacionales en el sistema estudiado (Galindo, 1983)

La espectroscopía Infrarroja se emplea para identificar y determinar cuantitativamente la presencia de distintas sustancias en mezclas. También se pueden obtener las bandas de las sustancias procedentes de la mezcla, con el fin de hacer una identificación de fases. Se fundamenta en la absorción de la energía del infrarrojo (de la gama de longitudes de onda consideradas para el infrarrojo que están entre  $1\mu\text{m}$  y  $100\mu\text{m}$ ) por la muestra, que es equivalente a su energía de vibración. Estas energías de vibración son características de las moléculas, las cuales dependen a su vez, de los tipos de enlace, pues las frecuencias de vibración dependen de la rigidez de los enlaces (Morcillo, 1980). Las razones por las que se ocupan en el presente trabajo estas dos espectroscopías se relacionan a los grupos funcionales que se pretenden ubicar, los que se pueden ocultar en otras frecuencias, especialmente en la espectroscopía infrarroja, debido a la amplitud de la señal del agua y OH<sup>-</sup> (un ejemplo es el ion carbonato). De este modo, la espectroscopía infrarroja tiene la posibilidad de usarse para una gama muy extensa de grupos funcionales y, la espectroscopía Raman para determinar con precisión algunos grupos funcionales que por sus frecuencias de vibración son muy semejantes (Parker, 1983).

## **2.7. Fechamiento por DRX: Método de índice de Cristalinidad y Colágeno residual.** **El uso de la técnica de Difracción de Rayos X aplicada al fechamiento**

### **2.7.1. Colágeno residual**

Las disminuciones del contenido de la fase amorfa en el material óseo, debido a la degradación de colágena, se puede cuantificar por diferencia de pesos al calcinar la muestra generándose así la técnica de fechamiento por colágena residual. Para obtener los datos de material calcinado y masa original se hace una simple operación para obtener

el porcentaje de pérdida de esta fase. La masa ocupada puede variar y lo costoso de esta técnica es el tiempo que se requiere para proceder y obtener los datos, de tal forma que se vuelve cansada y tediosa. En este trabajo, se propone una variante del análisis por colágeno residual, llevando a cabo experimentos de difracción de rayos X. Donde se ocupa la siguiente relación para llevar a cabo la cuantificación de la colágena

$$I_{RX} = (I_{20} / I_{m\acute{a}x}) 100$$

Siendo  $I_{20}$  el pico característico de la fase amorfa (colágena) para  $2\theta = 20^\circ$  e  $I_{m\acute{a}x}$  el pico con intensidad más alta de la fase de carbonato de hidroxapatita, aproximadamente en  $2\theta = 32^\circ$ .

### 2.7.2. Índice de cristalinidad

El análisis de los datos obtenidos de experimentos de difracción de material óseo antiguo llevó a ciertos autores a considerar la técnica como posible prospecto para determinar antigüedades relativas (Bartsiokas & Middleton, 1992 Person, *et al.* 1995).

Las fechas obtenidas a partir del llamado índice de cristalinidad, se relacionan con las alturas y grosores de ciertos picos (o intensidades) característicos del carbonato de hidroxapatita, estos máximos de intensidad característicos del carbonato de hidroxapatita corresponden a las intensidades 112, 300 y 202, que según el modelo de estos autores (Bartsiokas, *et al.* 1992) se relaciona con la fecha de muerte del organismo. Con este mismo procedimiento, sólo que tomando como límite inferior de cada reflexión una horizontal, es el caso del otro autor (Person, *et al.* 1995), que adicionan un dato más, correspondiente al pico 211, y su método siendo un poco distinto al de los autores anteriores, en realidad no define mucho (los picos correspondientes a cada uno de los índices hkl se representan en la fig. 10).

Al medir esos parámetros se obtiene un cociente (ver fig. 10), que se relaciona con la antigüedad del organismo, creando así, una gráfica de antigüedades Vs. índices de cristalinidad considerada como "de alta relación lineal", con lo que, se supone podrían obtenerse fechas de muerte. Tal índice de cristalinidad (de Bartsiokas) se define como:

$$\text{Índice de cristalinidad} = 10 (a/b)$$

Dónde  $a$  y  $b$  son alturas de los picos en el patrón de difracción (Ver fig. 10) (Según Bartsiokas & Middleton, 1992).

Los autores determinan que su grupo tiene una representatividad muy buena, con lo que afirman que su técnica de fechamiento puede ser ocupado para distintas épocas, distintos organismos y distintos entornos (Bartsiokas & Middleton, 1992). Con esta visión, distintos autores han discutido estos resultados y algunos han hecho variaciones, que sin dar una interpretación microestructural, intentan mejorar la técnica, variando algunos parámetros como el conocimiento de los contextos de enterramiento, las especies de los organismos, etc. (Person, *et al.* 1995). Estos autores definen el índice de cristalinidad como:

$$\text{Indice de cristalinidad} = (u+v+w)/h$$

Dónde  $u$ ,  $v$ ,  $w$  y  $h$  son alturas de los picos en el patrón de difracción (Ver fig. 10) (Person, *et al.* 1995)

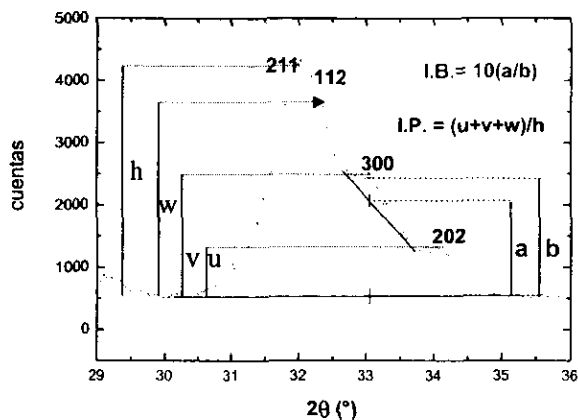


Figura 10. Representa los datos que algunos autores ocupan para fechar material óseo. En realidad sólo difieren un poco en el método y en una intensidad. En el caso del Índice de cristalinidad de Bartsiokas & Middleton, 1992. I.B. = 10 (a/b) y para Person, *et al.* 1995 consiste en I.P. =  $(u+v+w)/h$  (ver Bartsiokas & Middleton, 1992 Person, *et al.* 1995).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de tejido óseo antiguo de origen antropológico fueron obtenidas del laboratorio de fechamiento, del Instituto de Investigaciones Antropológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México a cargo de la M. en C. Luz Lazos Ramirez y del proyecto de estudios de maestría de la M. en C. Heju Jang Cho, del mismo Instituto.

Las muestras de tejido óseo antiguo, de distintas clases de animales proceden de la colección del museo-laboratorio de Paleontología de la Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada y fueron donadas por el M. en C. Francisco Javier Aranda Manteca. Las muestras de tejido óseo actual de distintas clases de organismos proceden de colecciones particulares.

Las muestras fueron sometidas a distintos tratamientos, dependiendo la información que se deseaba obtener y la cantidad de muestra. Para esto se hicieron divisiones entre material antiguo y moderno y posteriormente las respectivas divisiones taxonómicas (ver la relación de muestras que se presentan en este trabajo y sus tratamientos en el cuadro 1).

*Cuadro 1. Relación del nombre de las muestras con sus Características y análisis al que fueron sometidas.*

Muestra	Tipo de muestra	Sometida a análisis
Sireno2.	Antigua, Fósil. Permineralizada, Costilla de sireno.	DRX, DSC, MEB.
Ballena	Actual. Cráneo.	DRX
Cranave	Actual, cráneo de ave.	DRX
Crancone	Actual, cráneo de conejo.	DRX
Crancarp	Actual, cráneo de carpa.	DRX
Cranroed	Actual, cráneos de roedor.	DRX
Cranrana	Actual, cráneo de rana.	DRX
Crantort	Actual, cráneo de tortuga.	DRX
Mochorej	Actual, cráneo humano.	DRX
Crancoco	Actual, cráneo de cocodrilo.	DRX, IR e R
Crantib	Actual, cráneo de tiburón.	DRX
Cazontib	Actual, cráneo de cazón.	DRX
Crandelf2	Actual, cráneo de delfín.	DRX
M1	Actual, hueso largo de vaca.	DRX, TT y nuclear.
M2	Antigua, hueso largo de vaca no fósil.	DRX, nuclear.
M3	Antigua, no fósil. Arqueológico, Humano.	DRX, nuclear.
M5	Antigua, no fósil. Arqueológico, Humano.	DRX, nuclear
M6	Antigua, no fósil, venado.	DRX, nuclear
G0 (Granada)	Actual, radio humano.	DRX, DSC y TQ.
Poll.	Actual, fémur de pollo para producción de carne.	MEB

DRX=Difractometría de rayos X, DSC=Calorimetría diferencial de barrido, MEB=Microscopía electrónica de Barrido, R=Espectroscopía Raman, IR= Espectroscopía Infrarroja, TT=tratamiento térmico y TQ=tratamientos químicos.

### 3.1. Preparación de muestras y condiciones experimentales

Se prepararon muestras de tejido óseo con los siguientes fines:

- Separar la componente amorfa (principalmente colágena tipo I) por tratamientos térmicos, químicos y físicos (como la ultracentrifugación). Con la separación de la colágena, la componente mineral aislada (carbonato de hidroxapatita), pudo ser sometida a los análisis de estructura, cantidad de carbono, calcio y nitrógeno, cristalinidad, y tipo de grupos funcionales incorporados a la estructura.
- Examinar los cambios de la estructura en función de la temperatura, o tratamientos químicos en una muestra de tejido óseo.
- Análisis estructural por la técnica de difracción de rayos X en los diversos tipos de tejido óseo.
- Fechamiento relativo de muestras antiguas de tejido óseo mediante las metodologías propuestas por Bartsiokas & Middleton, 1992 y Vento, *et al.* 1981 (colágeno residual).

#### 3.1.1. Experimentos de Difracción de rayos X

La técnica ocupada por nosotros fue la de polvos, de esta forma, las muestras fueron molidas en un mortero de ágata y luego tamizadas (malla # 325). Se ocupó un difractómetro Siemens D5000 para polvos, con un tubo de rayos X con radiación  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1.54056 \text{ \AA}$ ), con un generador Kristalloflex operando a 40kV y 28mA. La configuración de rendijas fue: 2mm a la salida del tubo 2mm al inicio de recepción, 0.6mm en el monocromador y 0.6mm en el detector. Los experimentos se realizaron llevando a cabo un barrido por etapas en  $2\theta$  desde 8 hasta 80 , con un tamaño de paso  $\Delta 2 \theta = 0.02^\circ$  en un tiempo de 9 segundos.

#### 3.1.2. Métodos de separación

##### Tratamientos químicos HCl (ácido clorhídrico 5%) y NaClO (hipoclorito de sodio 12%)

- Un par de muestras granada (G0), fue pulverizado y sumergido en una solución de HCl 0.1 N durante una hora.
- Estas mismas muestras fueron sometidas a NaClO a distintos tiempos (20 min., 60min., y 24 h.)

La determinación de los cambios en las fases y cantidades de materia amorfa y cristalina se cotejaron por difracción de rayos X.

##### Tratamientos térmicos

El conjunto de muestras procedente de un hueso de radio humano (etiquetados como granada ó G0), fueron finamente pulverizadas en un mortero de ágata, y tratadas a distintos tiempos (0, 3, 12 y 72 horas) a una temperatura de 650°C. Con esto se buscó seguir la evolución de las componentes del hueso (carbonato de hidroxapatita, colágena y fases secundarias) y la concentración de elementos químicos (Ca, C, N) en función del

tiempo de tratamiento a 650°C.

Con el fin de identificar las temperaturas en las cuales ocurren transiciones de fase (por ejemplo la oxidación del nitrógeno y carbón relacionados con la fase orgánica), se dieron tratamientos térmicos a otro lote de muestras (etiquetadas como m14, hueso de diáfisis de fémur humano) a diferentes temperaturas: 25°C, 396°C, 500°C y 850°C, durante una hora.

### 3.1.3. Centrifugación y tratamientos térmicos

Se pulveriza un hueso en un mortero con bolas de ágata, se tamiza (con una malla # 325) y posteriormente se calienta, con agua, hasta hervir durante un periodo determinado de tiempo, y se ultracentrifuga en caliente (en nuestro caso se ocuparon tubos eppendorf de 1.5 ml). De esta forma se separan las fases orgánica e inorgánica. Esta técnica se fundamenta, en cierto modo, en la centrifugación por diferentes densidades, ya que al calentar la muestra, hay una disociación de los trimeros de colágena e integración de estas a la fase acuosa, generando dos fases, donde la más densa corresponde al carbonato de hidroxiapatita y la menos densa a la colágena y otros amorfos orgánicos.

### 3.1.4. Experimentos de Análisis térmico (DSC y TGA)

Se usó un equipo modular de análisis térmico DUPONT 9000 (módulo calorímetro de barrido, DSC y módulo para termogravimetría, TGA). Las muestras para análisis térmicos fueron puestas en crisoles de aluminio y calibradas con estos mismos crisoles. Lo único que diferencia a una muestra y otra, en su preparación, fue la masa puesta en dicho crisol de aluminio que, según la densidad de la muestra, oscilaba entre 1.5 mg para el caso de la colágena y 5 mg para las muestras con fase cristalina. Los intervalos de temperatura empleados fueron desde temperatura ambiente hasta 600°C (para DSC) y 650°C (para TGA) a una velocidad de 10°C/min.

### 3.1.5. Técnicas Nucleares: P.I.X.E. y R.B.S.

Las muestras después de haber sido tamizadas, se prepararon en una pastilladora de acero inoxidable (con un centímetro de diámetro) a una presión de 2.5 toneladas métricas. Las pastillas se expusieron al haz de un acelerador de partículas Pelletron NEC de 3.0 MV, en la terminal de alto voltaje, equipado con una cámara para el análisis simultáneo por R.B.S.-P.I.X.E.

### 3.1.6. Microscopía Electrónica de Barrido (M.E.B.)

En el caso de nuestras muestras, debido a que poseen zonas cristalinas, lo único que se hizo fue introducirlas al microscopio electrónico, con una película de plata al vacío, para aumentar la conductividad electrónica. El tamaño de grano expuesto al haz de electrones fue menor que 44µm (se ocupó un tamiz del # 325). Por otro lado se analizó el hueso sin la parte correspondiente a las sustancias orgánicas, la forma de retirar las sustancias orgánicas fue por combustión (650° C por 72 horas) seca en un horno. Para estos análisis se ocupó un microscopio JEOL 5200 operando a un voltaje de 25 KV.

### 3.1.7. Espectroscopías Raman e Infrarroja

Se montaron muestras mezcladas con KBr en una concentración de 10 (KBr): 1 (muestra) y se hicieron 30 repeticiones de cada análisis. El peso de la muestra fue 10 mg para cada uno de los análisis. Se ocupó un espectrómetro marca Nicolet para registrar los espectros de Infrarrojo (FTIR) y Raman. Los intervalos en que se llevaron los registros fueron entre 400 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  (para Infrarrojo) y entre 70 y 3400  $\text{cm}^{-1}$  (para Raman).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Modelo propuesto en este trabajo para la inclusión de $\text{CO}_3^{2-}$

Los datos bibliográficos indican que en los sitios de  $\text{PO}_4^{3-}$ , se tiene la sustitución por el grupo carbonato  $\text{CO}_3^{2-}$ , en porcentajes de entre el 8-10%. Las cargas de los fosfatos desbalancean las de los carbonatos, por lo tanto debería existir un ion monovalente que equilibre las cargas. Para el caso anterior, de balance de cargas, supusimos la existencia un oxhidrilo (OH) en el interior de la estructura, entre el carbonato y las torres de Calcio N.C. 9 (ver fig. 11), el cual estaría formando la punta de una pirámide que tendría de base al ion carbonato (ver figuras 5, 8 y 11). En esta pirámide que tiene como base al ion carbonato, se tendría a todos los oxígenos (incluyéndose el del ion OH) en los vértices, quedando de esta forma el hidrógeno del ion OH, interno en la pirámide, en resonancia con los pares libres de electrones de los oxígenos de la base de  $\text{CO}_3^{2-}$  (Heredia, A. *et al.* 1998).

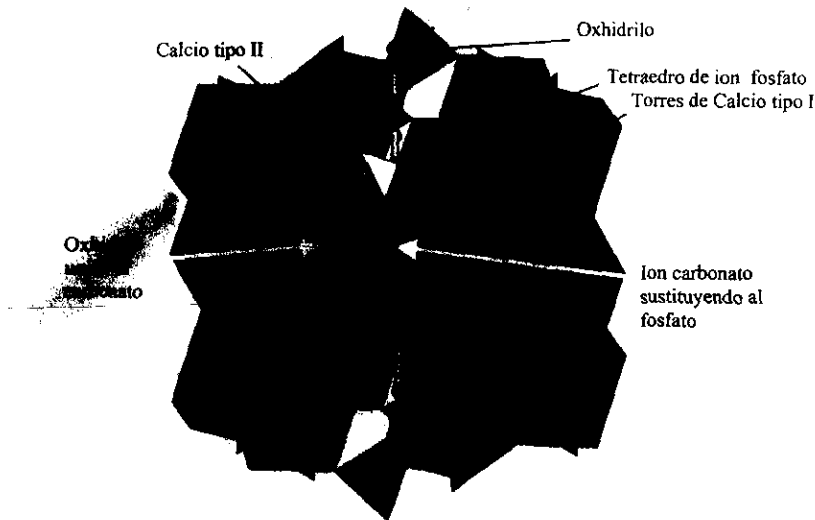


Fig.11. Modelo propuesto en este trabajo para sustituir un ion fosfato por un carbonato más un oxhidrilo, marcados estos últimos dos con flechas blancas.

#### 4.2. Análisis del modelo propuesto por el método de Rietveld

Mediante la metodología Rietveld se modeló la inclusión del  $\text{CO}_3$  y al hacer el ajuste se obtuvieron datos realmente satisfactorios para la muestra de sirenio (fig. 12 y tabla 5). Se eligió la muestra de sirenio por no contener material orgánico ni impurezas, de este modo, no se requirió hacerle ningún tratamiento, asegurándose así, la no contaminación o alteración del material óseo. Estos datos fueron posteriormente utilizados para modelar también los otros espectros de difracción presentados en este trabajo (ver tabla 6).

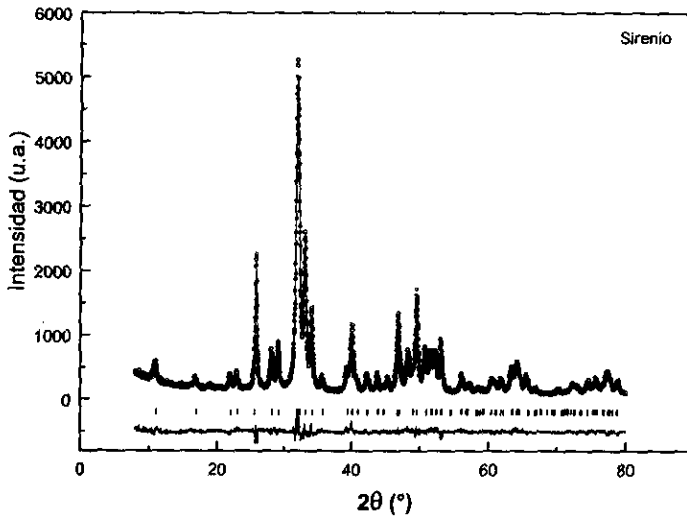


Fig. 12. Diffractograma de la muestra Sirenio donde se ajusta el modelo estructural, por el método de Rietveld. En pequeños círculos se muestra el espectro observado, en línea continua el espectro calculado. En la parte inferior se muestra la curva que muestra la diferencia del espectro observado con el calculado. En barras verticales se indican las posiciones de las reflexiones de Bragg.

Las figuras de mérito para evaluar la calidad del ajuste por el método de Rietveld están definidas por las siguientes expresiones:

$$Rwp = 100 \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N w(y_i^{obs} - y_i^{calc})^2}{\sum_{i=1}^N w(y_i^{obs})^2}} \quad \text{R del perfil pesado} \quad (12)$$

$$R_{exp} = 100 \sqrt{\frac{N - P + C}{\sum_{i=1}^N w(y_i^{obs})^2}} \quad \text{R esperado} \quad (13)$$

$$X^2 = \left( \frac{R_{wp}}{R_{exp}} \right)^2 \quad \text{Bondad del ajuste} \quad (14)$$

$$RB = 100 \frac{\sum_{j=1}^{N_{ref}} |I_j^{obs} - I_j^{calc}|}{\sum_{j=1}^{N_{ref}} |I_j^{obs}|} \quad \text{R de Bragg} \quad (15)$$

$$RF = 100 \frac{\sum_{j=1}^{N_{ref}} \left| \sqrt{I_j^{obs}} - \sqrt{I_j^{calc}} \right|}{\sum_{j=1}^{N_{ref}} \left| \sqrt{I_j^{obs}} \right|} \quad \text{R del factor de Estructura} \quad (16)$$

La calidad de los refinamientos, además de determinarse a partir de los valores anteriores, es de mucha utilidad observar gráficamente las diferencias entre los valores calculados y los esperados (fig.12). Los datos mostrados en la tabla 5 y la gráfica 12 son indicativos de la buena calidad del ajuste por el método de Rietveld, del modelo propuesto.

Tabla 5. Valores de bondad del ajuste por el método Rietveld de la muestra de sirenio (de la fig.12)

Muestra.	Número de Parámetros refinados	Valores de las diferencias entre los resultados observados y esperados.	Parámetros de la Red (Å).	"Y" isotrópica y valor de Lorenz.
Sirenio2 Costilla de sirenio. Fósil.	18	$X^2=3.56$ , $RB=5.83$ , $Rf=3.39$	$a=9.3436$ $c=6.8793$	$Y=0.14676$ $Ls=0.18081$

### 4.3. Análisis por el método de Rietveld de huesos modernos

En nuestro caso, se ocupó la estructura de la hidroxiapatita y se incluyeron átomos de carbono, permitiendo así, la sustitución principalmente propuesta; la cual es de un  $\text{CO}_3^{2-}$  (más  $\text{OH}^-$ ) por un  $\text{PO}_4^{3-}$ . Los valores más bajos para las figuras de merito en huesos modernos (ver tabla 6), al momento de llegar a la convergencia, indican que es el valor de mínima diferencia entre ambas gráficas. En este análisis también contemplamos la morfología del cristalito, asignando forma de agujas para la fase mineral de los huesos modernos. A mayor valor de los parámetros Y y Ls indicados en la tabla 5 y 6, se tienen tamaños promedio de cristalito más pequeños y grado de anisotropía mas elevado respectivamente.

Tabla 6. Aquí se presentan variaciones estructurales de distintos tipos óseos y los valores que confrontan lo observado con lo esperado en la metodología Rietveld.

Hueso. Tipo y origen.	Número de Parámetros Refinados.	Valores de las diferencias entre los resultados observados y esperados.	Parámetros de la Red (Å).	"Y" isotrópica y valor de Lorenz.
Sirenio2 Costilla de sirenio. Fósil.	18	$X^2=3.56$ RB=5.83, Rf=3.39	a=9.3436 c=6.8793	Y=0.14676 Ls=0.18081
Ballena (actual)	15	$X^2=4.48$ RB=8.16, Rf=4.36	a=9.43907 c=6.90585	Y=0.68272 Ls=0.4445
Cranave (cráneo de ave actual)	15	$X^2=4.15$ RB=6.68, Rf=4.28	a=9.42502 c=6.89673	Y=0.65275 Ls=0.45089
Crancone (cráneo de conejo actual)	15	$X^2=6.05$ RB=12.04, Rf=5.37	a=9.424272 c=6.892123	Y=0.69109 Ls=0.34506
Crancarp (cráneo de carpa actual)	15	$X^2=6.17$ RB=10.4, Rf=5.14	a=9.41257 c=6.90158	Y=1.24528 Ls=0.00132
Cranroed (cráneos de roedor actual)	15	$X^2=2.89$ RB=6.09, Rf=3.11	a=9.469029 c=6.898454	Y=0.88199 Ls=0.6185
Cranrana (cráneo de rana actual)	15	$X^2=4.78$ RB=6.41, Rf=3.81	a=9.48659 c=6.9280	Y=0.71223 Ls=0.78481
Crantort (cráneo de tortuga actual)	15	$X^2=4.86$ RB=8.55, Rf=4.41	a=9.385984 c=6.873302	Y=1.38613 Ls=0.37878
Mochorej (cráneo humano actual)	15	$X^2=4.38$ RB=8.3, Rf=4.81	a=9.442676 c=6.911037	Y=0.51271 Ls=0.42963
Crancoco (cráneo de cocodrilo actual)	15	$X^2=7.7$ RB=6.97, Rf=3.56	a=9.429207 c=6.900091	Y=0.66213 Ls=0.48846
Crantib (cráneo de tiburón actual)	15	$X^2=2.9$ RB=5.06, Rf=2.65	a=9.422988 c=6.886841	Y=0.72917 Ls=0.6127
Cazonitb (cráneo de cazón)	13	$X^2=2.32$ RB=9.67, Rf=6.3	a=9.37407 c=6.84436	Y=0.79887 Ls=0.77338
Crandelf2	35	$X^2=7.41$ RB=6.11, Rf=3.94	a=9.39339 c=6.8941	Y=0.28665 Ls=0.33448

En la figura 13a y 13b se puede observar la variación de los parámetros reticulares (o parámetros de la red) de acuerdo con distintos tipos de animales actuales.

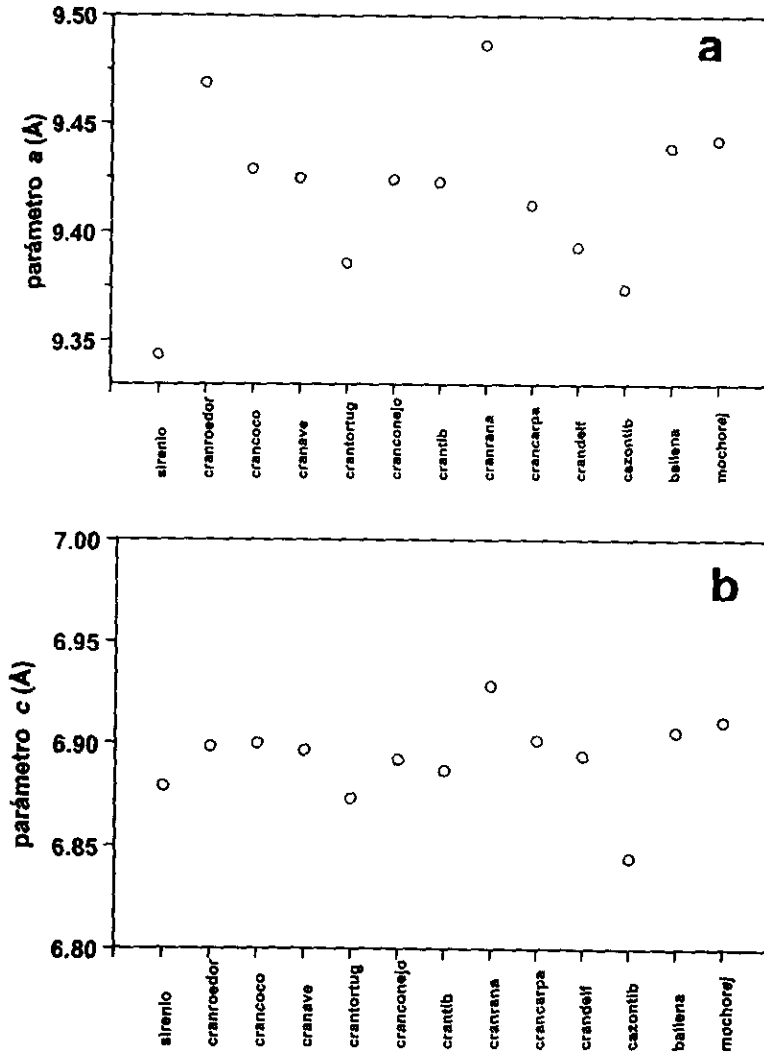


Fig. 13. Variación de los parámetros reticulares con el tipo de animal: (a) parámetro reticular a (b) parámetro reticular c.

#### 4.4. Análisis de hueso: hidroxiapatita y fase amorfa

El análisis de la estructura cristalina del carbonato de hidroxiapatita, para todos los tipos óseos, se modeló bajo la metodología Rietveld. En todos los casos se observaron los picos característicos de la hidroxiapatita, los cuales coinciden, en su mayoría, con los del carbonato de hidroxiapatita. En la mayoría de los casos, excepto en algunas de las muestras tratadas (térmicamente y/o químicamente, que claramente disminuyen la cantidad de materia amorfa), o muy antiguas, se observó una gran cantidad de fase amorfa, que por comparación con los difractogramas, determinamos que se trata de colágena tipo I.

Los datos determinados en la muestra de cráneo de tiburón (o cazón) a partir del refinamiento de Rietveld los consideramos como buenos y los ocupamos para determinar los parámetros de la fase amorfa, es decir, la colágena tipo I asociada a los cristallitos de carbonato de hidroxiapatita (ver fig.14 y tabla 7). Estos parámetros se obtienen usando la ecuación de Debye (ver 2.1. Difracción de Rayos X; ecuaciones 7 y 8), que es una suma infinita de términos, pero su uso en la metodología Rietveld sólo posee hasta seis (aunque pueden ocuparse más) por considerarse que es un número suficiente de términos para representar adecuadamente la dispersión amorfa de la colágena.

Los distintos parámetros obtenidos por nosotros relacionan a las distancias más comunes en la colágena, tal como enlaces típicos. Estas distancias pueden ser los periodos de la hélice, las distancias más comunes entre los grupos funcionales, etc., tal como lo mostramos en la tabla siguiente (tabla 7).

Tabla 7. Se presentan distancias típicas de la molécula de colágena tipo I y su procedencia. Estas distancias están relacionadas con las estructuras que definen la estructura tridimensional, desde la estructura secundaria hasta la cuaternaria.

Modelo	Amino-amino (en Å)	Carboxilo-amino del mismo a.a.* (en Å)	Carbón-oxígeno del carboxilo terminal (en Å)	Diámetro de la superhélice (en Å)	Periodo de una sola hélice (en Å)
Por Pauling <sup>1</sup>	3.5	2.5	1.5		
Datos generales <sup>2</sup>				5.0	10
Por nosotros: (Método de Rietveld)					
$d_{ij}$	3.42	2.55	1.20	5.07	10.99
$B_{ci}$ <sup>(3)</sup>	792	-900	-970	-282	244

a.a. = aminoácido.

<sup>1</sup> Pauling y Corey, 1951.

<sup>2</sup> Voet, D. & Voet, J., 1995.

<sup>3</sup>  $B_{ci}$  son parámetros son proporcionales al producto de los factores de dispersión de los átomos i, j y a la frecuencia en que se presenta la distancia interatómica  $d_{ij}$  en la estructura de la colágena tipo I.

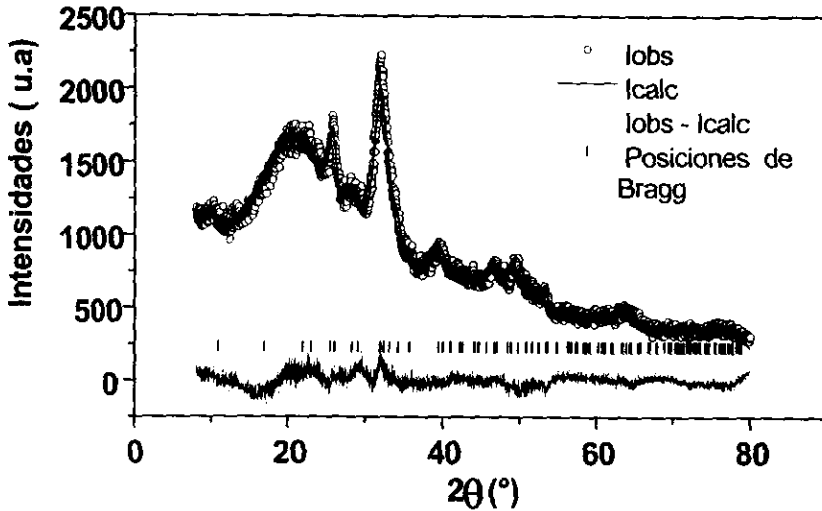


Fig. 14. Patrón de difracción de cráneo de tiburón. Muestra refinada mediante el método de Rietveld, para obtener los parámetros estructurales de la fase amorfa (I<sub>obs</sub>= espectro obtenido del difractómetro, I<sub>calc</sub>=espectro obtenido con modelaje mediante el método Rietveld, I<sub>obs</sub>-I<sub>calc</sub>=diferencias entre el difractograma obtenido y el calculado).

#### **4.5. Relación de los tratamientos térmicos y químicos con la estabilidad del material óseo**

##### **4.5.1. Tratamientos y Análisis térmico**

En el análisis de DSC notamos distintas transiciones del material. Hay un primer valle (antes de la línea vertical, ver fig.15 A) que no corresponde a la muestra, sino a la estabilidad de la velocidad de calentamiento. El pequeño valle y posterior elevación, marcado con 2 lo explicamos a partir de la deshidratación de la muestra. En los picos señalados como 3 y 4 no los hemos podido asociar, de forma explícita, a cambios en el tejido óseo, pero en relación a cada una de las fases (la fase mineral y la fase cristalina), la pérdida del material amorfo orgánico se genera por su combustión y eliminación de la muestra, cercano a 350°C (fig.15 B).

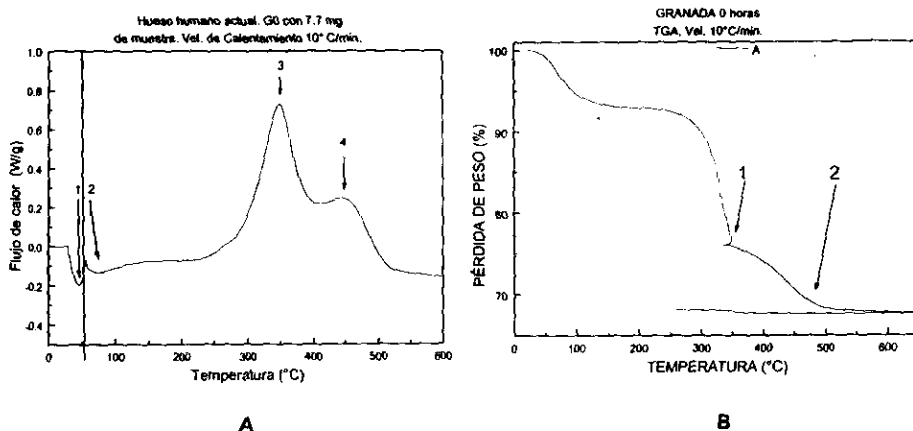


Fig.15 A y B. Gráfica de flujo de calor Vs. Temperatura (A). Calorimetría Diferencial de Barrido de una muestra de hueso humano (G0). Consideramos que el valle con número 1 corresponde a la estabilización de la velocidad de calentamiento. Por esto consideramos pertinente contemplar los datos posteriores a este valle. El pequeño valle numerado con 2, corresponde a la deshidratación de la muestra (cercano a 100° C). Los picos 3 y 4 no los hemos asociado, con precisión, a un evento térmico pero creemos que guarda relación con el desprendimiento de energía por parte de los componentes de la colágena tipo I o con cambios estructurales en la porción apatítica. Gráfica de temperaturas Vs. pérdida de peso (B). Análisis termogravimétrico; en la caída 1 se ha perdido cerca del 25% del peso total y es debida a la fase orgánica. En la caída 2 se ha perdido más del 30% del peso total de la muestra.

Se hace evidente que la cresta correspondiente a 450° C está relacionada a la fase inorgánica y no a la orgánica, esto se observa en la muestra fósil de costilla de sirenio, dónde sólo se tiene la fase mineral (fig.16). Hay autores que piensan que algunas de estas crestas, especialmente la cercana a 350° C (la que no se aprecia en la fig. 16 y sí en la fig.17), se deben al flujo de iones en la estructura del carbonato de hidroxapatita (Reyes-Gasga.J. et al.1997, Reyes-Gasga. J. et al 1999). Nosotros sólo podemos decir que no se trata de la fase mineral, sino de la fase orgánica (fig 15).

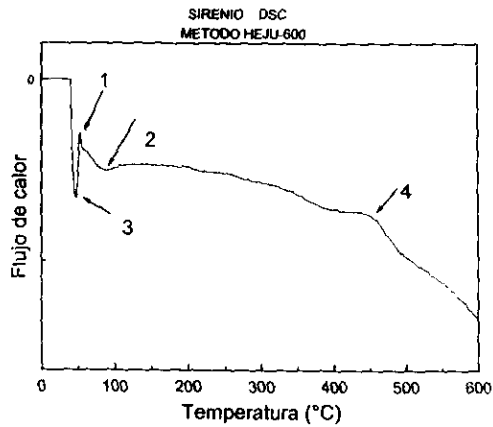


Fig. 16. Calorimetría diferencial de Barrido de una muestra de costilla de sirenio fósil. Como en la figura anterior, la cresta y el valle 1 y 3, respectivamente, están asociados a la estabilización de la velocidad de calentamiento y, el valle 2 corresponde a la deshidratación de la muestra (cercano a 100° C), la cresta numerada con 4 no la hemos asociado, todavía a un proceso químico específico.

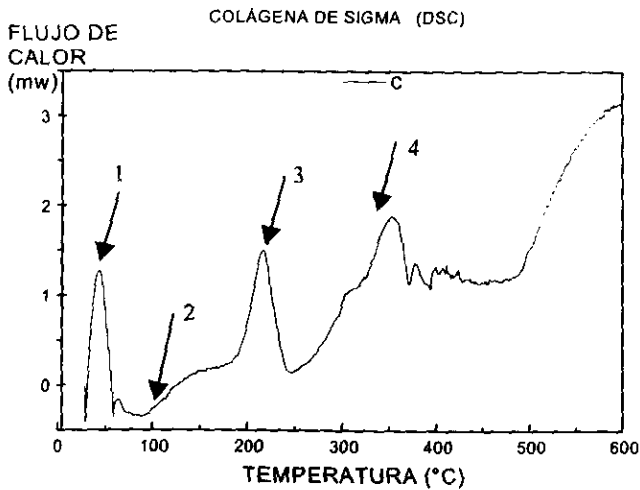


Fig. 17. Calorimetría Diferencial de barrido de una muestra de colágena de tendón de aquiles de Bovino (SIGMA). La cresta 1 corresponde a la estabilización de la velocidad de calentamiento (como en las dos figuras anteriores). La región 2 corresponde a la deshidratación de la muestra, la región 3 no se ha asociado a un proceso en particular, pero pensamos que se relaciona a reacciones entre los residuos de aminoácidos; la cresta 4 (que es cercana a 350° C) sólo aparece en las muestras de colágena y es la temperatura a la que algunos autores (Reyes-Gasga, et al.1997, 1999) reportan conductividad superiónica en la fase inorgánica.

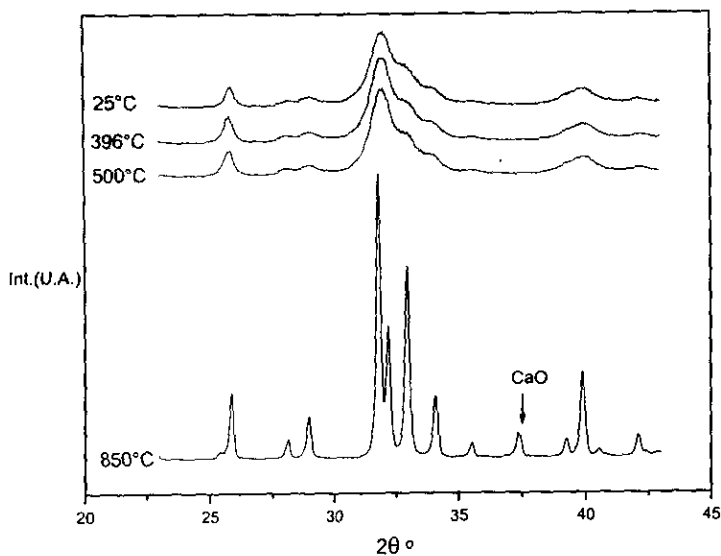


Fig. 18. Patrón de difracción de Rayos X (muestra m1). Se aprecian los cambios en las fases, incluyendo la aparición de una (cerca a  $37.5$  de  $2\theta$ ), que corresponde a óxido de Calcio (CaO, es decir, cal) debida a la combustión del material óseo. Se observan cambios en la cristalinidad, representados por el aumento de las intensidades (alturas de las reflexiones) y disminución del ancho del pico. La gráfica donde se indica la fase de CaO está calcinada a  $850^\circ\text{C}$ .

Los cambios generados en las estructuras gracias a la calcinación del material a distintos tiempos son producto de la oxidación del material cristalino y amorfo, tal como cuando se genera CaO. Cuando se somete al material óseo, a distintos tiempos de calcinación hay un aumento de las intensidades y disminución de los grosores de los picos, lo que indica que la fase cristalina se hace más cristalina (fig.18).

#### 4.5.2. Tratamientos químicos

En los tratamientos químicos, el hueso pulverizado o completo, resultó sumamente estable a los reactivos, lo cual se demuestra en el tamaño del "fondo" en los difractogramas a diferentes tiempos de exposición a los reactivos, indicando una pérdida mínima de colágena, al grado de no haber diferencias apreciables entre estos difractogramas (ver fig 18), lo que indica que los tiempos de exposición o concentraciones deben variar, por lo menos para una metodología como la seguida por nosotros.

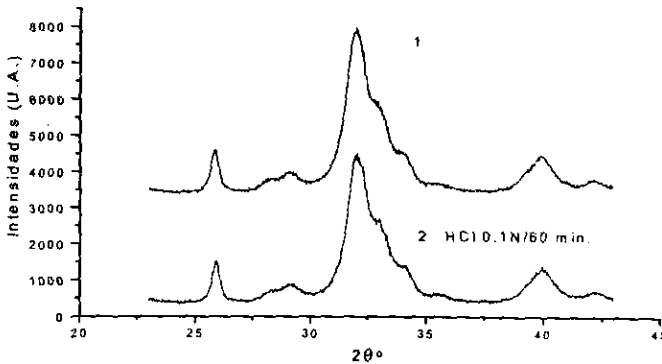


Fig.19. Patrón de difracción de Rayos X de una sola muestra de material óseo (muestra G0), tratada con HCl y sin tratar. La gráfica (1) sin tratamiento químico y la (2) tratada con HCl 0.1 N/ 1 hr. No se aprecian cambios que determinen pérdida de material orgánico o inorgánico, es decir, no se ve diferencia entre los patrones de difracción 1 y 2. La mayoría de las citas bibliográficas indican que el HCl es un reactivo que modifica claramente la composición química y microestructural del tejido óseo (Parsche & Nerlich, 1997, Johnsson, 1997).

La mayoría de los datos bibliográficos indican que el HCl es un reactivo que modifica claramente la composición química y microestructural del tejido óseo, del tipo que se trate (Parsche & Nerlich, 1997, Johnsson, 1997). Sin embargo nuestros resultados no comprueban lo citado en la literatura basándonos en los mismos tratamientos.

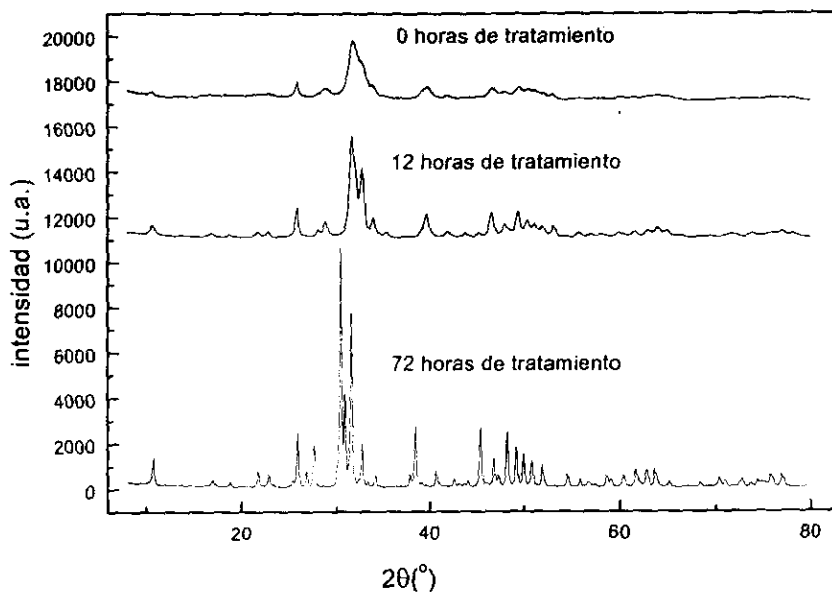


Fig.20. Cambios de las estructuras cristalinas a partir de calcinación (a  $650^{\circ}\text{C}$ ) a distintos tiempos (muestra ml). El aumento de los picos y disminución de grosores de estos mismos implica que se están generando cambios estructurales en el microcristal, tal como el aumento del tamaño en estos.

#### 4.6. Análisis Elemental por Técnicas Nucleares

Algunas fórmulas estequiométricas para la Colágena tipo I se pueden escribir como:

$\text{C}_4\text{H}_{5.7}\text{O}_{1.3}\text{N}$  (De: índice Merck, ver gelatina (gelatin),

$\text{C}_{3.6}\text{H}_{5.5}\text{O}_{1.13}\text{NS}_{0.009}$  (De: Vaughan, 1970.)

De aquí se puede calcular que el valor de nitrógeno por gramo de hueso es aproximadamente del 5%.

**4.6.1. R.B.S - P.I.X.E. Simultáneos:**  
**P.I.X.E. para Calcio y Fósforo. R.B.S. para Oxígeno y Carbono.**

En el caso del carbón detectado, no se puede determinar si pertenece a una sustancia orgánica (colágena tipo I) o a una inorgánica (ion carbonato). Por lo que se planearon experimentos para detectar las diferencias en este tipo de átomos, basándose en aportar cada una de las fases y hacer el análisis, de tal modo que se puedan apreciar cambios en los tipos atómicos y en concentraciones, como para poder desprestigiar estos átomos de una u otra fase.

*Tabla 8. Resultados de R.B.S.- P.I.X.E. en muestras de interés arqueológico de hueso.*

Muestra	Ca	C	P	O	Ca/P
1 vaca	10	5.64	5.71	27.86	1.7513
2 vaca	10	0.371	5.71	26.4	1.7513
3 Humano	10	9.56	5.71	32.34	1.7513
5 Humano	10	2.06	5.97	27.6	1.675
6 venado	10	9	5.71	28.6	1.7513

**4.7. Datos de Microscopía Electrónica de Barrido**

Para esta técnica (M.E.B. fig. 21) se ocupó plata para recubrir las muestras, por la poca conductividad electrónica de estas. Las imágenes obtenidas por microscopía de barrido determinan que los gránulos de carbonato de hidroxiapatita aumentan con respecto al tiempo, no sólo eso, también las muestras antiguas carecen sustancialmente de compuestos orgánicos (Fig. 21 A y B). En este contexto, se determina que las muestras carecen de compuestos orgánicos por el poco brillo que presentan, indicando que, hay buena conductividad electrónica. Las muestras seleccionadas para este trabajo fueron las de costilla de sireno (fósil) y las de hueso de pollo (tratado con HCl), las cuales presentan cambios, no sólo por las distintas antigüedades, sino también por las diferencias específicas entre grupos. Las estructuras con materiales amorfos, como las proteínas, se observan como superficies rugosas que, creemos, corresponden mayoritariamente a proteínas asociadas a los microcristales de cHAP, como en el caso de la muestra tratada de pollo (fig. 21 C y D).

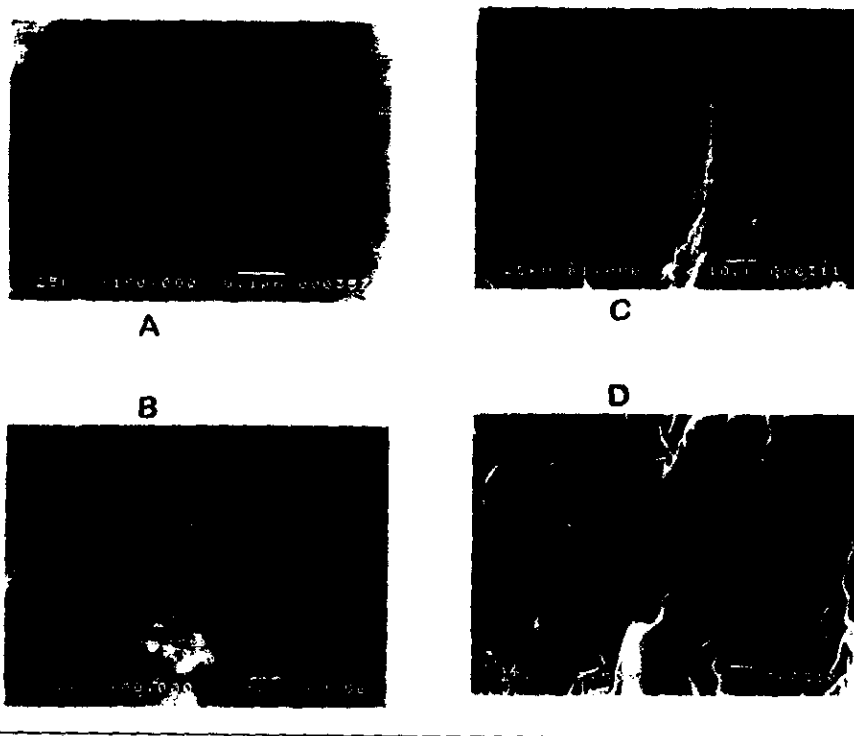


Fig. 21. ABCD. Micrografías electrónicas de barrido de tejido óseo de (A y B) Costilla de Sirenio fósil y (C y D) fémur de pollo tratado con HCl 0.1 N. Sólo son dos muestras, con respectivas ampliaciones, que son B y D. En el caso de la Costilla de sirenio (A y B) se aprecian gránulos de hidroxapatita de cerca de 50 nm de diámetro. Para la muestra de fémur de pollo (C y D) se observan estriaciones producto de las proteínas asociadas al mineral óseo, y su ampliación (en D) corresponde a la región con un óvalo blanco.

#### **4.8. Datos de Espectroscopías Raman e Infrarroja.**

Gran parte de los datos ofrecidos por la literatura (Best, *et al.* 1997, Merry, *et al.* 1998, Wu, *et al.* 1999), para ubicación de tipos de grupos funcionales está basada en sintéticos, pues el análisis de materiales biológicos es realmente difícil de interpretar. Uno de los grandes debates, relacionado con la estructura del carbonato de hidroxapatita consiste en localizar especialmente dos tipos de iones; el carbonato y el oxhidrilo. En el caso del oxhidrilo, hay autores (Wu, *et al.* 1999) que establecen que este tipo de iones no están presentes en el mineral óseo y sí consideran la existencia de carbonato. Los valores,

para la identificación, de estos grupos funcionales son:

Para O-H y  $\text{CO}_3^{2-}$   $3600\text{cm}^{-1}$  Para espectroscopía Infrarroja (Best, S., *et al.* 1997).

Para sustitución de  $\text{CO}_3^{2-}$  entre  $1410$  y  $1540\text{ cm}^{-1}$ , también para Espectroscopía Infrarroja.(Merry, J.C., *et al.* 1998).

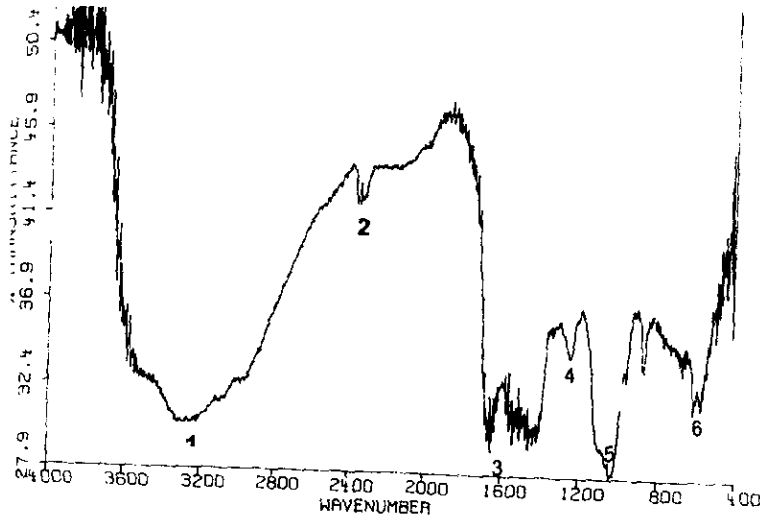


Fig. 22. Espectroscopía Infrarroja (Número de onda Vs. Transmisión) de tejido óseo procedente de cráneo de cocodrilo. Se señalan algunos grupos funcionales relacionados exclusivamente con las fases presentes en el tejido óseo.

1. Amina en solución ( $\text{NH}_3^+$ ). A aprox.  $3280\text{ cm}^{-1}$ .
2. Tíol enlazado a un hidrógeno, a aprox.  $2400\text{ cm}^{-1}$ .
3. Amina primaria ( $\text{NH}_2$ ) de  $1650-1580\text{ cm}^{-1}$ .
4. Amina alifática (C-N) de  $1220$  a  $1020\text{ cm}^{-1}$ .
5. Ester fosfórica (P-O-C) de  $1090$  a  $1030\text{ cm}^{-1}$ .
6. Disulfuro (S-S) de  $550-450\text{ cm}^{-1}$ . Cercanamente a este se ubican enlaces característicos de derivados de yodo (de  $600$  a  $80\text{ cm}^{-1}$ ).

En general, para la estructura de la colágena, podemos determinar la presencia de grupos relacionados a los aminoácidos, tal como los  $\text{COO}^-$  ( $\text{CO}_2^-$ ), los amino- y los C-H ((Leikin, S., *et al.* 1997) ver fig. 22). Los espectros Raman e Infrarrojos de un material compuesto son ciertamente difíciles de interpretar, pues los componentes pueden ser similares en sus grupos funcionales, es por esto que se pretende siempre estudiar las fases por separado, en nuestro caso el carbonato de hidroxiapatita con la fase amorfa, es decir, la fase protéica, en forma mayoritaria colágena tipo I (ver fig.24, espectroscopía Raman de Tendón de Aquiles).

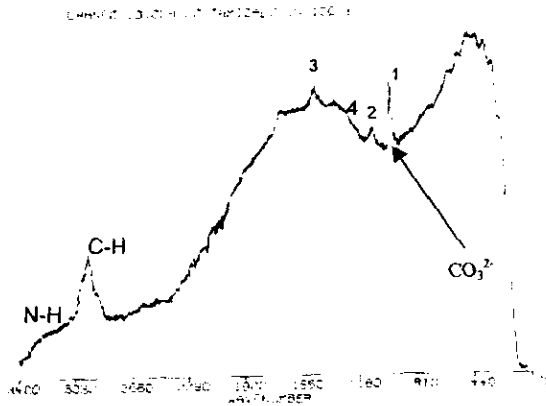


Fig. 23. Muestra de tejido óseo tamizado de cocodrilo actual. Los ejes son: Intensidades (Unidades arbitrarias) Vs. Frecuencias (ondas  $\text{cm}^{-1}$ ).

Se muestra la Espectroscopia Raman de hueso, con algunas frecuencias características de grupos funcionales como:

1. Piridinas con sustituciones en las posiciones 2 y 4, (en las longitudes de onda entre  $1000$  y  $985 \text{ cm}^{-1}$ ), enlace C-O del carbonato (en  $1078 \text{ cm}^{-1}$ , Esta frecuencia tomada de: Tu, A.T. 1982).
2. Alquil Sulfatos  $\text{SO}_2$  ( $1196$ - $1188 \text{ cm}^{-1}$ ).
3. Iones carboxilato  $\text{CO}_2$  (entre  $1440$ - $1340 \text{ cm}^{-1}$ ).
4. Entre  $1198$  y  $1211 \text{ cm}^{-1}$  Para hidroxiprolina y tirosina.

(Frecuencias de: Parker, F.S. 1983.)

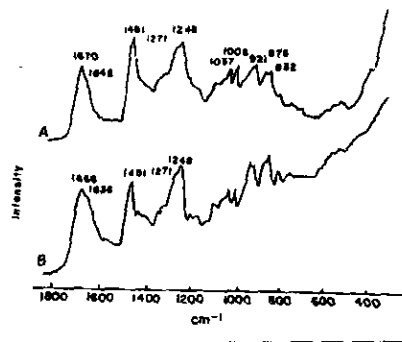


Fig. 24. Espectro Raman de colágena de tendón de Aquiles de bovino (A) y (B) de gelatina de piel de ternera (Tomado de: Parker, F.S. 1983).

Podemos deducir, de las figuras 23 y 24, que la mayoría de los datos aportados por ambas espectroscopías corresponden a grupos funcionales de la colágena, esto es debido a la gran diversidad molecular a partir de los aminoácidos. En estas muestras de tejido óseo es evidente la presencia de grupos funcionales que no están relacionados con ninguna de las fases, lo que indica, consideramos, que son producto de la relación de ambas fases; tal es el caso del grupo funcional P-O-C, el cual puede (y sólo puede) estar relacionado con la interacción de:

1. El carbonato de la hidroxiapatita y el fosfato de algún aminoácido.
2. El carboxilo de un aminoácido con el fosfato de la hidroxiapatita.

Los grupos funcionales descritos desde un inicio, en este trabajo no necesariamente fueron ubicados en los espectros Raman o Infrarrojos, lo cual consideramos debido a las distintas fases, a la hidratación, etc., que pueden originar sobreposiciones de algunos picos en grupos funcionales determinados; en el caso del ion carbonato se aprecia un pico (señalado con una flecha) en todas las muestras que está muy cercano a la señal de las piridinas.

#### 4.9. Relación del Índice de Cristalinidad con la Microestructura en la cHAP y antigüedad de huesos arqueológicos.

En los análisis hechos a muestras antiguas de tejido óseo y la obtención de su respectivo índice de cristalinidad, tenemos que los resultados no coinciden con la propuesta original de los autores Bartsiakos, & Middleton, 1992, Person, *et al.* 1995. La exposición de estos resultados (tabla 9 y fig. 25 y 26) sólo indican una gran dispersión en los datos infiriendo la no relación entre estos valores (los de índice de cristalinidad) y las correspondientes antigüedades.

Tabla 9. Muestra los índices de cristalinidad y las antigüedades de las técnicas propuestas. Es evidente la diferencia en cifras de una técnica y otra, a partir de los valores obtenidos.

Muestra.	I.C. B*	I.C. P.**	I.DRX.***	Antigüedad (años).
M1	2.55	6.50		100
M3	3.11	1.60		600
M4	3.68	5.00		1500
M5	3.60	2.14		800
M6	1.84	0.50		2500
M7	3.95	2.97		300
m8	8.31	0.11		550
Cuicuil2	1.88	0.19	7.58	2250
h1	3.22	0.10	9.1682	614.5
Oztoy-14	2.81	0.10	8.6234	1450
Tlat197	3.23	0.16	8.8531	3150
Tlat27	0.98	2.97	7.3215	3150
h2-Xcamb	3.23	0.19	7.7124	1350
Tlaloc15	3.24	0.22	6.5904	1300
G0h-L	1.73	0.00	14.0165	30
SnJeroM3	1.32	0.02	12.4682	274.5
Xoch-e17	1.83	0.00	10.6876	1250
Mochorej	1.11	0.03	18.486	1.5
Snpeu7e5	3.33	0.26	6.5418	185
Snppu1e1	1.40	0.03	16.2333	185
Snjer-m1	2.15	0.00	12.1366	274.5
Snpu7e16	0.97	0.00		185
Snpu7e18	0.21	0.02		185
Cuicuil1	2.68	0.17		2250
Hicuitz	5.17	0.25	10	4.5E6
Equid-il	7.24	0.45		4.5E6
Crandelf	3.79	0.21		1.5
g0-3sem	4.34	0.23		30
Bovinen	2.03	0.02		250
Mandibula de Mastod.	4.32	1.65		25,000

\*I.C. B. Índice de Cristalinidad de Bartsiakos y Middleton.

\*\*I.C. P. Índice de Cristalinidad de Person, A, *et al.* Como el I.C.B. está multiplicado por un factor de 10, se hizo lo mismo con este, para equiparar los datos.

\*\*\*I.DRX Índice de fechamiento con datos obtenidos de los espectros de difracción de rayos X.

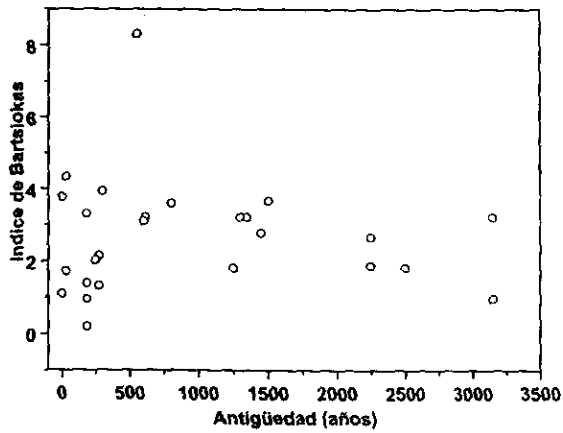


Fig.25. Gráfica de Antigüedades (años antes del presente) Vs. índice de Cristalinidad propuesto por Bartsiokas, et al. 1992. Consideramos muestras con un mismo contexto de enterramiento, aun así la variación entre los datos y el índice de cristalinidad es muy evidente.

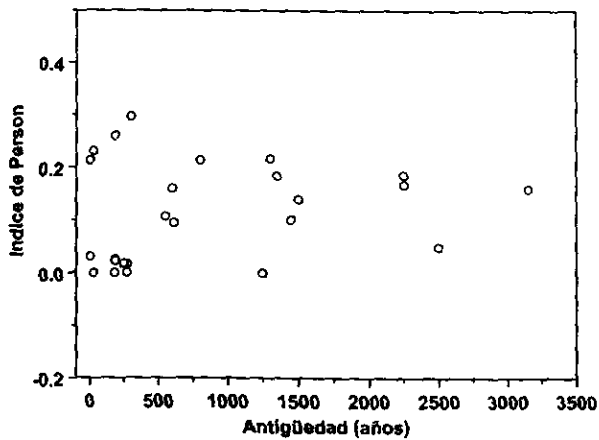


Fig.26. Gráfica de Antigüedades (años antes del presente) Vs. índice de Cristalinidad propuesto por Person, et al. 1995. Consideramos muestras con un mismo contexto de enterramiento, aun así la variación entre los datos y el índice de cristalinidad es muy evidente, lo que, consideramos, invalida esta metodología de fechamiento.

Sin embargo, en la modificación del método de colágeno residual presentada en este trabajo para fechar material óseo a partir de las intensidades a cierto ángulo en el patrón de difracción sí se logra establecer una tendencia (Fig. 27), tendencia que los mismos autores también logran establecer a partir de calcinación del material óseo, sin hacerlo a temperaturas donde se genera esta fase (Wysoczanski - Minkowics. 1969).

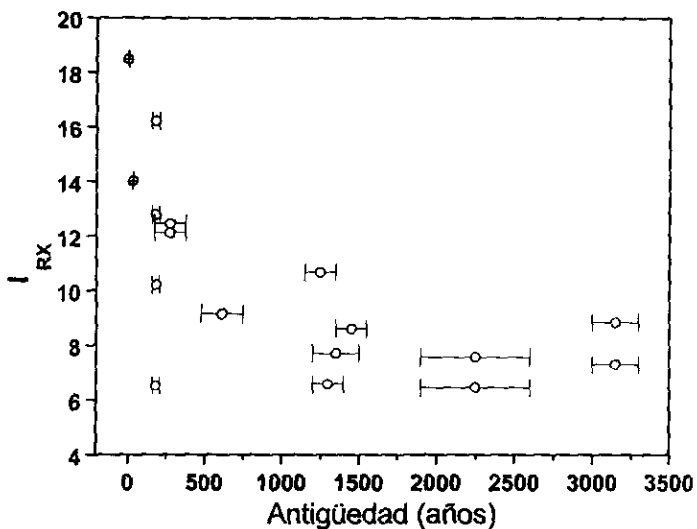


Fig.27. Gráfica de Antigüedades (años antes del presente) Vs. índice obtenido a partir de Difracción de rayos X propuesto por Vento. et al,1981. Consideramos muestras con un mismo contexto biológico, observando algo semejante a un decaimiento exponencial.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Modelo de Inclusión de ion Carbonato

Todos los datos bibliográficos describen (ver 1. Generalidades Sobre el tejido óseo) una gama muy amplia de iones que se pueden encontrar en la estructura del carbonato de hidroxapatita, sin ser descrita su incorporación con detalle.

El modelo propuesto por nosotros consiste en intercambiar un ion fosfato (los tetraedros de la figura 5) por un carbonato enlazado, mediante un puente de hidrógeno, (ver figura 11) a un ion  $\text{OH}^-$ . Este modelo es compatible con la idea de un ensanchamiento (o disminución) de la estructura cristalina en el parámetro  $a$  observada en el carbonato de hidroxapatita presente en huesos de distintas clases de animales (figura 13a, 4.Resultados). De esta manera, otros iones como K, Na, Sr, etc. se acomodarian en la estructura ensanchando o contrayendo el parámetro  $a$  afectando muy poco el valor del parámetro  $c$  (como se puede observar en la figura 13b del capítulo 4).

Con respecto a los datos obtenidos de las espectroscopías, se puede determinar la existencia del grupo  $\text{CO}_3^{2-}$  en la estructura (a los 1410, 1540 y 3600  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro infrarrojo, y a los 1078  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro Raman). En el espectro infrarrojo, la señal de los modos vibracionales de  $\text{CO}_3$  se solapa con las señales asignadas para  $\text{OH}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y otros grupos, de modo que no es obvia la interpretación. En los espectros Raman, la señal que corresponde al grupo  $\text{CO}_3$  se observa mas clara (figura 23, capítulo 4).

Observando otros picos menos importantes, destaca de manera especial, la correspondiente a los enlaces P-O-C. Esta señal puede estar relacionada con la interacción entre las fibras de colágena y microcristales (Lacout & Taitai, 1994). No se ha descrito con detalle si la interacción colágena-microcristales involucra un carbón de carbonato o de aminoácido y tampoco si el fósforo está en la parte orgánica, como parte de un aminoácido o en la inorgánica, como parte del ion fosfato en el cristal, dando lugar al estudio de interfaces en bioestructuras, interfaces semejantes a las fibras de colágena tipo I asociadas a una fase inorgánica cristalina.

### 5.2. Análisis de Huesos Modernos

En las muestras de cráneo de delfin (crandelf), donde se encontraron picos con intensidades sumamente altas y estrechas, se interpretó como un tamaño de cristal mayor que las otras muestras. En este caso, se trata de una muestra tratada con el mismo procedimiento técnico que el resto de las muestras, además se hizo una repetición de los experimentos y del análisis y los resultados fueron los mismos. Una situación que pudo influir en el aumento de la cristalinidad de la muestra mencionada fue la interacción de esa muestra con materiales altamente cristalinos y soluciones iónicas, pues fue encontrada en una región costera donde el común denominador del medio, contempla altas concentraciones de iones, que pudieron originar cambios estructurales internos, tal como sustituciones iónicas, traduciéndose en aumento del tamaño de cristal.

Bajo este marco, descartamos la existencia de distintas fases, producto de la interacción con otros minerales, pues los difractogramas de estas muestras no presentan intensidades correspondientes a otras estructuras cristalinas.

Los parámetros reticulares  $a$  y  $c$  muestran valores con de dispersión distintos, teniendo el parámetro  $a$  más variaciones que el parámetro  $c$ , en los distintos tipos de huesos de animales modernos. Esto está de acuerdo con el modelo de estructura propuesto por nosotros para el carbonato de hidroxiapatita, donde los iones  $a$  que se incluyen en la estructura, preferentemente ocasionan variaciones en el parámetro  $a$ .

En el caso de las muestras de tiburón (Caztib) también se observaron ciertas modificaciones microestructurales, como ensanchamiento del fondo a partir de las grandes cantidades de materia amorfa. En realidad esta muestra es la que presenta mayor cantidad de fase amorfa y enmascaramiento de picos por esta. El refinamiento del espectro de difracción de rayos X de esta muestra incluyó el uso de la ecuación de Debye.

### **5.3. Difracción de rayos X en Colágena tipo I amorfa**

El uso de la ecuación de Debye para modelar la componente amorfa (colágena tipo I) nos permitió constatar que es posible determinar algunos parámetros de tipo estructural en la colágena I. Dentro de estos parámetros figuran las distancias interatómicas más frecuentes presentadas en la estructura colagénica. Esto abre toda una gama de posibilidades, relacionada con la capacidad de determinar algunos parámetros de ese tipo de sólidos, sin necesidad de cristalizarlos (ver tabla 7 fig.14). La importancia de no hacer los análisis de la sustancia monocristalina, o simplemente cristalina, radica en que la naturaleza tiene un diseño y generalmente para estudiarlo hay que transformarlo, siempre infiriendo los posibles cambios estructurales producto de la manipulación del objeto de estudio; teniendo pérdidas de información.

Es entonces que las posibilidades de estudiar los materiales en un estado lo más parecido al original pueden proporcionar los datos más cercanos a la realidad; especialmente cuando se trata de bioestructuras y sus interfaces.

### **5.4. Generación de fases inorgánicas y estabilidad térmica del material óseo**

#### **5.4.1. Fases inorgánicas**

La génesis de nuevas fases en el material óseo (por tratamiento térmico) está relacionada con la técnica de fechamiento de material óseo, por colágeno residual, donde se mide la masa perdida por la muestra (colágena) al tratarse a una cierta temperatura. Sin embargo, los autores de esta posible técnica de fechamiento no hablan de la aparición de otras fases, ni de la salida del ion carbonato del carbonato de hidroxiapatita (Vento, *et al.* 1981) que podrían traer variaciones en las medidas y alterar los datos relacionados a cambios en peso, hidratación y variaciones estructurales.

Nosotros detectamos, que cuando el material óseo es tratado a 850°C, aparece como nueva fase el óxido de calcio (CaO, de nombre común cal). Este dato es muy importante porque hay una gran cantidad de trabajos científicos que ocupan indistintamente valores de temperatura para hacer síntesis y separación de compuestos inorgánicos con fines biomédicos y de diseño de biomateriales (Suetsugu, & Tanaka, 1999., Cüneyt Tas, 1997, Yin Hsu, *et al.* 2000) sin contemplar la existencia de CaO, lo que, necesariamente generaría cambios en el resultado, pues lo que siempre se espera tener es hidroxiapatita, o a lo más, carbonato de hidroxiapatita.

#### 5.4.2. Estabilidad térmica del material óseo

Nosotros analizamos, además del material óseo, también a cada uno de sus componentes y notamos que los cambios son de la porción orgánica, es decir, de la colágena tipo I (SIGMA). Son claramente identificables las señales relacionadas con la deshidratación de la muestra y pérdida de material por combustión y no por cambios de fase (fig.15 A y B).

Consideramos que hacer otro tipo de análisis resultaría de mucha ayuda para conocer los procesos químicos que atraviesa la desnaturalización de las fases óseas; estos análisis podrían ser espectroscopías Infrarroja y Raman bajo el intervalo de interés, donde se encuentran las transiciones que hemos observado y que estamos reportando en este trabajo.

#### 5.5. Microestructura y fechamiento.

La técnica de fechamiento mediante los datos de difracción de rayos X los hemos considerado muy dispersos y sin un significado diagenético concreto (ver fig. 13, 25 y 26). Descartamos entonces que a través de los índices de cristalinidad definidos por Bartsiakas (1992) o por Person (1995) se pueda implementar una técnica de fechamiento de muestras de tejido óseo. Por otro lado, la técnica de colágeno residual adaptada a la medición de colágena por técnicas de difracción de rayos X, muestra una tendencia que resulta de interés analizar con mas detalle a fin de poder establecer su utilidad como técnica de fechamiento.

#### 5.6. Análisis elementales por técnicas nucleares

De forma general, presentamos solo un grupo de datos de muestras antiguas, que por R.B.S.- P.I.X.E. fueron caracterizadas. Sólo elegimos un grupo de elementos químicos que están en mayor proporción en este tejido, que, consideramos, son el "común denominador" para las muestras óseas de cualquier antigüedad y tipo (ver 4.6. Análisis elementales por técnicas nucleares). Los valores para la hidroxiapatita sintética dan un cociente Ca/P= 1.666 y los valores típicos encontrados por nosotros (tabla 8) son de 1.75. El valor de este cociente está de acuerdo con la idea de grupos fosfato, por grupos carbonato; reforzando nuestro modelo de sustitución iónica en el cristal de carbonato de hidroxiapatita.

### **5.7. Interacciones colágena I - cristal**

Lo descrito en términos de establecer una relación amorfo-cristal, hay algunos autores (Mann, 1993) que establecen la gran importancia de esta interfase, que contempla la forma en que se asocian los cristales y las sustancias no cristalinas, sean estas orgánicas o inorgánicas.

La forma de asociación de estas dos fases se puede observar a dos niveles: el primero a nivel estructural y el segundo a nivel químico. Esto va encaminado a relacionar ciertas regiones de ambas estructuras desde el punto de vista geométrico y el químico. Esto es más claro cuando se muestran y comparan los parámetros estructurales tanto de la colágena tipo I como del carbonato de hidroxiapatita. De esta manera tenemos que las dimensiones de la HAp son muy semejantes a las de la colágena tipo I, ambas tienen simetrías hexagonales (cuando se trata de moléculas colagenoides) y las dimensiones del parámetro *a* de la colágena tipo I es de 12.5 Å, es decir, sólo supera a la de la HAp (ver 1.6. Modelos estructurales propuestos en la literatura para el carbonato de hidroxiapatita) por algunos Angstroms. Para encontrar las relaciones precisas entre estas dos fases tendríamos que localizar en la porción de la colágena tipo I todo un grupo de aminoácidos fosfatados siendo preferentemente la glicina, por ser el más común. De esta forma echaríamos a un lado las propuestas de que la interacción entre las dos fases, desde la nucleación hasta la mineralización completa, se genera a partir de los grupos funcionales amino de los aminoácidos, como lo proponen algunos autores (Viidik & Vuust, 1980.) aunque también consideramos que es importante profundizar en este tipo de estudios, pues es la única forma de resolver este problema con precisión.

### **5.8. Microscopía Electrónica**

El crecimiento de los cristales, en el caso de el tejido fósil de sirenio (fig. 20 A y B), es un proceso abiótico, es decir, producto de un proceso diagenético, conteniendo casi exclusivamente materiales cristalinos, por lo cual se observan gránulos relativamente bien definidos a gran aumento (100 nm). Estos gránulos no podrían ser originados a partir del recubrimiento argéntico, pues presentan variación morfológica que no se aprecia en los gránulos de los recubrimientos por aspersión, es decir, los gránulos generados por el recubrimiento son muy homogéneos en términos morfológicos. De otro modo las muestras fueron preparadas simultáneamente, lo que nos indica que las diferencias en las muestras no son originadas por el recubrimiento.

Las imágenes obtenidas a partir de la microscopía electrónica indican que la relación de las fibras de colágena y cristales de carbonato de hidroxiapatita es realmente estrecha, a tal grado de no poder diferenciar entre una fase y otra a aumentos de unos cientos de nanómetros por microscopía de barrido (ver fig.20).

La imagen del tejido de pollo (fig. 20 C) se muestra muy homogénea en cuanto a su microestructura. Si los granulos (más pequeños que en el caso de la muestra de sirenio) son monocristales, entonces son mucho mas pequeños que los de la muestra de sirenio. Esto es

clara evidencia de un crecimiento de los cristalitas por el proceso de diagénesis.

### 6. CONCLUSIONES

1. Se logró establecer un modelo estructural que incorpora el ion Carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) dentro de la estructura de la apatita
2. Debido a la estrecha relación química entre la fase correspondiente a la colágena tipo I y el carbonato de hidroxiapatita resultó infructuoso aislar esta última fase, usando técnicas químicas. Con tratamientos térmicos por arriba de  $850^\circ\text{C}$  se elimina la componente colagénica del hueso y aparece CaO como fase secundaria; algo no observado en la hidroxiapatita sintética.
3. Se determinaron los cambios en la celda unidad del carbonato de hidroxiapatita en muestras óseas de distintos tipos de animales, mediante el uso de la metodología de Rietveld, teniendo como resultados, variaciones apreciables en el parámetro  $a$ , y pocas variaciones en el  $c$ , apoyando el modelo de sustitución iónica propuesto en este trabajo para el carbonato de hidroxiapatita.
4. Se aplicó satisfactoriamente la ecuación de Debye para modelar la intensidad de rayos X dispersada por la componente amorfa (colágena tipo I) presente en el tejido óseo, obteniendo un conjunto de valores estrechamente relacionados con los datos reportados para la estructura de la colágena tipo I reportada en la literatura. Este conjunto de valores son las distancias interatómicas más frecuentes presentes en la molécula de colágena.
5. Se implementó una técnica de análisis semicuantitativo para establecer la proporción de colágena en tejido óseo de manera que es posible deducir un esquema de degradación en función de la antigüedad.
6. Se pudo usar la metodología citada en el punto anterior para evaluar la aplicabilidad del método de fechamiento relativo por colágeno residual, obteniendo resultados satisfactorios.
7. Se estableció que el índice de cristalinidad definido tanto por Bartsiakos como por Person, no tienen reproducibilidad y por lo tanto, no resultan adecuados para fechamiento de material óseo antiguo, siguiendo la metodología seguida por los autores que la diseñan.

## GLOSARIO

- Amorfo, material.** Sustancia con un desarreglo interno que se refleja en carencia de orden a largo alcance.
- Árbol filogenético.** Representación esquemática de la evolución de un organismo o un grupo. También llamado árbol genealógico o evolutivo (Watson, J., *et al.* 1987)
- Biomíneralización.** Depósito de sustancias inorgánicas debido a procesos biológicos.
- Biomaterial.** Material o sustancia, utilizada sola o en la fabricación de un dispositivo médico encaminado a interactuar con los tejidos humanos para monitorear funciones del cuerpo o para tratar condiciones patológicas del mismo. Sinónimo de material biomédico.
- Bragg, ley de.** Ver Condición de Bragg.
- Celda primitiva.** Celda unidad con sólo puntos de red en los vértices.
- Celda unidad.** Paralelepípedo que, por traslación, da origen a la disposición macroscópica del cristal.
- Cerámica.** Materiales compuestos por elementos entre metales y no metales, como óxidos, carburos y/o silicatos.
- Colágenas.** (Lat. Cola= pegamento; gena, genos= generar, hacer). Proteínas estructurales de la matriz extracelular, las cuales contienen uno o más dominios que resguardan la conformación de triple hélice y que tienen en cada tercer aminoácido a la glicina (Rossert, J. & de Crombrughe. B. 1996.)
- Composite, material.** Tipo de materiales multicomponentes, generalmente compuestos de fibras reforzadas o mezclas de cerámicas y polímeros.
- Condición de Bragg (William Lawrence Bragg, 1913).**  $n\lambda = 2d \sin \theta$ . Donde n es un número entero,  $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos X, d es la distancia entre planos en el cristal y  $\theta$  es el ángulo de reflexión. Esta ecuación expresa el número de veces que se requiere para que el grupo de haces incidentes en la muestra estén en fase y se dé un máximo de reflexión. El ángulo obtenido determina las distancias entre los planos que corresponderían a los átomos en la muestra.
- Difracción.** Desviación que experimentan las ondas en su propagación rectilínea cuando chocan con obstáculos o cuando penetran por aberturas.
- Diagénesis.** Procesos de erosión en material arqueológico.
- Electron-Voltio (eV).** Unidad de energía utilizada a menudo en los cambios energéticos que conllevan las transiciones de electrones de unos niveles a otros de energía en los átomos. Como indica su nombre es el producto de la carga de un electron por un voltio.  $1\text{eV} = 1.602 \times 10^{-12}$  ergios (Diccionario de Química, 1985.).
- Esfuerzo.** Cambio en la forma.
- Estequiometría (gr. Stoiheion; elemento. Metron; medida).** Relaciones cuantitativas de las reacciones químicas.
- Estructuras de resonancia.** Cada una de las estructuras que representan a una molécula con un mismo ordenamiento de sus núcleos atómicos pero difieren en el arreglo de sus electrones. La molécula es en sí un híbrido de resonancia de todas estas estructuras y no puede ser representada satisfactoriamente por ninguna de ellas.
- Fijar.** Volver inalterable un objeto, en biología se aplica a tejidos o grupos celulares.
- Filogenia.** Historia de la evolución de una especie o grupo. Se basa, en que los organismos vivos provienen de organismos en común (Encyclop. Brit. 1974).
- Hematopoyesis, hemopoyesis.** Génesis de sangre.
- Homeostásis.** Procesos biológicos de autorregulación para mantenerse estables ante condiciones ambientales (Encyclop. Brit. 1974).
- Hueso Antiguo.** Material óseo procedente de restos arqueológicos.
- Hueso Moderno.** Material óseo no arqueológico.
- Implante.** Material no vivo puesto en el organismo (Rivera, M. E. M. 1997).
- Injerto.** Material vivo puesto en el organismo.
- Interspecíficos.** Entre especies biológicas.
- Isotropía.** Se dice que un cuerpo es isotrópico si sus propiedades físicas no son dependientes de la dirección a lo largo del cuerpo en el cual se mide.
- Lamelar (Lat. Lamellae).** Que tiene forma de lámina
- Material.** Sustancia sólida para confeccionar un objeto.
- Mecanotransductor.** Que traduce estímulos mecánicos en otro tipo de señal.

- Nucleación.** De forma general, es el depósito de material inorgánico, por sobresaturación, en un lugar específico. Término que hace referencia a la formación de hueso en las oquedades de la colágena tipo I.
- Número de coordinación.** El número de átomos o moléculas directamente ligados a un átomo central.
- Objeto fractal.** Son objetos que aparecen estadísticamente similar sobre un rango de escalas (Majumdar, *et al.* 1993.).
- Ontogenia.** Formación y desarrollo del individuo.
- Osificación.** Procesos que resultan en formación de hueso.
- Osteoblasto.** Célula productora de colágena.
- Osteoclasto.** Célula descalcificadora. Su línea celular procede de macrófagos de células madre de la sangre.
- Osteoporosis.** Pérdida de la densidad en mineral óseo.
- Pascal (Pa).** Unidad de presión. Esta definida como  $1\text{N}/\text{m}^2$ .
- Resonancia.** Estado de vibración de un sistema oscilante cuando sobre él se actúa periódicamente mediante una acción externa, si el periodo de dicha acción coincide con el periodo de vibración de aquél.
- Tafonomía.** (gr. Tafos; entierro y Nomos; ley, norma.) Lo que le ocurre a un organismo desde su muerte hasta que se le encuentra.
- Taxa.** Plural de taxón.
- Taxón.** Unidad de clasificación biológica que busca agrupar organismos según sus características.
- Técnica Nuclear o de origen nuclear.** Que conlleva reacciones nucleares.
- Tejido.** Asociaciones de células especializadas y sus productos que se organizan espacialmente en patrones definidos para completar funciones.
- Osteoclasto.** Célula descalcificadora. Su línea celular procede de macrófagos de células madre de la sangre.
- Remodelaje.** Proceso de formación y absorción de hueso.
- Rietveld, Método de.** Refinamiento de estructuras a partir del modelado, en una computadora, del patrón de difracción, punto a punto, de un experimento de difracción policristalina.
- PoliA (Poliadenilación).** Concatenación de moléculas de Adenina en el término 3' de la mayoría de los RNA mensajeros de eucariontes (Watson, J. 1987.).
- Viscoelástico.** Propiedad con la que un material responde diferente a distintas cantidades de carga. En hueso, esta propiedad se debe al agua contenida en el tejido.

## REFERENCIAS

- Adams, E. 1978. Invertebrate Collagens. *Science* V. 202, 10 de Nov.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1994. *BIOLOGIA MOLECULAR DE LA CÉLULA*. 2ª. Ed. Omega. Barcelona, Esp.
- Bartsiokas, A. & Middleton, A.P. Characterization and Dating of Recent and Fossil Bone by X-Ray Diffraction. *Journal of Archaeological Science*. 1992, 19, 63-72.
- Best, S., Sim, S., Kayser, M., & Downes, S. 1997. The dependence of osteoblastic response on variations in the chemical composition and physical properties of hydroxyapatite. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. Vol.8. Pp 97-103.
- Brès, E.F. 1992. The use of high resolution electron microscopy for the study of biological crystals. En: *BIOMATERIALS- Hard Tissue Repair and Replacement*. European Materials Research Society Monographs, Vol.3. D. Muster Editor. Amsterdam, Holanda (The Netherlands).
- Bucio, G. L. 1997. ESTRUCTURAS CRISTALOGRAFICAS Y MAGNETICAS DETERMINADAS POR DIFRACCION DE RAYOS X Y DE NEUTRONES EN POLVOS DE GERMANATOS MIXTOS. Tesis de Doctorado en Ciencias (Física). Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México, D.F.
- Bu Park, J. 1984. *Biomaterials Science and Engineering*. Plenum Press. N. Y.
- Cabañas, G.M. 1998. Fundamentos de Cristalografía. En: *texturas cristalógraficas por difracción de rayos X y neutrones*. Sociedad Mexicana de Cristalografía. C.INV.EST.AV. México.
- Cárabez, T. A. 1998. Curso de microscopía electrónica I. Clase de aplicaciones biológicas. Sociedad Mexicana de Cristalografía.
- Carter, G. Joseph. 1990. *Skeletal Biomineralization: Patterns, Process and Evolutionary Trends*. V.I. Van Nostrand Reinhold. N.Y.
- Cevc, G., Cevc, P., Schara, M. & Skaleric, U. 1980. The caries resistance of human teeth is determined by the spatial arrangement of hydroxyapatite microcrystals in the enamel. *Nature* V. 286, 24 Jul.
- Combes, C., Rey, C., Freche, M. 1999. *In vitro* crystalization of octacalcium phosphate on type I collagen: influence of serum albumin. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. Vol. 10. Pp 153-160.
- Cüneyt Tas, A., Korkusuz, F., Timucin, M., & Akkas, N. 1997. An investigation of the chemical synthesis and high-temperature sintering behaviour of calcium hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) bioceramics. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. Vol. 8. Pp 91-96.
- Cormack, D.H. 1986. *Fundamentos de histología*. Ed. Harla. México.
- Currey, J.D. 1990. *Biomechanics of Mineralized Skeletons*. En: Carter, G. Joseph (Editor). *Skeletal Biomineralization: Patterns, Process and Evolutionary Trends*. V.I. Van Nostrand Reinhold. N.Y.
- Curry, N.A. Jones, D.W. 1971. Crystal structure of Brushite, Calcium hydrogen orthophosphate. *Journ. Of Chem Soc.*, p 3725-3729.
- Diccionario de Química. Ediciones Generales Anaya. Madrid. 1985.

- Dickens, B. Schroeder, L. W., Brown, W. E. Crystallographic studies of the role of Mg as a stabilizing impurity in beta-Ca(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. I. The crystal structure of pure beta-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. *Journ. Of Solid State Chem.* 1974. P. 232-248.
- DU PONT, 1987. Thermal Analysis Sistem 9900 Operator's Manual. Du Pont Co. E.U.A.
- Einhorn, T.A. Biomechanics of Bone. En : Principles of Bone Biology. Editores: Bilezikian, J.P., Raisz, L. G. & Rodan, G. A. 1996. Encyclopaedia Britannica. 1974. Londres
- Eyre, D.R. 1996. Biochemical Basis of Collagen Metabolites as Bone Turnover Markers. En : Principles of Bone Biology. Editores: Bilezikian, J.P., Raisz, L. G. & Rodan, G. A. 1996.
- Fernández, E. Planell, J.A., Best, S. M. & Bonfield, W. 1998 Synthesis of Dahllite Through a Cement Setting Reaction. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* Vol. 9. No. 12.
- Francillon-Vieillot, de Buffrénil, V., Castanet, J., Géraudie, F.J., Meunier, J.Y., Sire, L., Zylberberg & Ricqlés, A. 1990. Microstructure and Mineralization of Vertebrate Skeletal Tissue. En: Carter, G. Joseph. 1990. Skeletal Biomineralization: Patterns, Process and Evolutionary Trends. V.I. Van Nostrand Reinhold. N.Y.
- Fuentes, L. 1999. Introducción al Método de Rietveld. Segundo congreso Nacional de Cristalografía. Univ. Autónoma. De B.C.
- Galindo, S. 1983. Breve Introducción a la espectroscopia. Ciencias y técnicas 5. I.N.I.N. México.
- Giacovazzo, C., Monaco, H.L., Viterbo, D., Scordari, F., Gilli, G., Zanotti, G., Catti. M. 1995. Fundamentals of Crystallography. Editado por C. Giacovazzo. IUCr Texts on Crystallography-2. International union of Crystallography. Oxford science publ.
- Grynpas, M. Three-dimensional packing of collagen in bone. *Nature*, Vol. 265. Enero 27. 1977.
- Guyton, C. 1991. Tratado de Fisiología Médica. Ed Interamericana.
- Ham, Arthur. W. 1953. Histology. J.B. Lippincott Co. Philadelphia.
- Hames, B.D., Hooper, N.M. & Houghton, J.D. 1997. Instant Notes in BIOCHEMISTRY. *β*ios, Scientific Publishers. Springer, Leeds. U.K.
- Heaney, R.P. 1996. Calcium. En : Principles of Bone Biology. Editores: Bilezikian, J.P., Raisz, L. G. & Rodan, G. A. 1996.
- Heredia, A., Bucio, L., Vázquez, R. & Ruvalcaba, J.L. 1998. Estructura cristalina del carbonato de Hidroxiapatita : Un estudio en restos óseos antiguos y modernos. 2º Congreso Nacional de Cristalografía. Ensenada, B.C. México. Sociedad Mexicana de Cristalografía.
- Holmgren, S.K., Taylor, K. M., Bretscher, L. & Raines, R.T. 1998. Code for collagen's stability deciphered. *Nature* V. 392. 16 de abril pp. 666-667.
- Ivanovsov, G.P. 1956. Thermal and Diffusion Processes in Crystal Growth. En: Growth of Crystals. Shubnikov, A. V. & Sheftal, N.N. Editores. Academia de ciencias U.R.S.S.
- Johansson, S.A.E. (Editor) 1995. Particle-Induced X-Ray Emission Spectrometry. Chemical Analysis Series, Vol. 133.
- Johnsson, K. 1997. Chemical Dating of Bones Based on Diagenetic Changes in Bone Apatite. *Journal of Archaeological Science.* 24, 431-437.

- Koch, Paul L., Tuross, N. & Fogel, M.L. 1997. The Effects of Sample Treatment and Diagenesis on the Isotopic Integrity of Carbonate in Biogenic Hydroxylapatite. *Journal of Archaeological Science*, 24, 417-429.
- Lacout, J.L. & Taftai, A. 1994. Carbonate-Containing Europium Apatite. En: Hydroxyapatite and related Materials, Paul W. Brown & Brent Constantz.
- LeGeros, R. Z. 1994. Biological and Synthetic Apatites. En: Hydroxyapatite and related Materials, Paul W. Brown & Brent Constantz Ed.
- LeGeros, Z. Racquel, Trautz, R. O., LeGeros, J. P. Klein, E. & Shirra, W.P. 1967. Apatite Crystallites: Effects of Carbonate on Morphology. *Nature*, Vol. 155, marzo 17.
- Leikin, S., Parsegian, V. A., Yang, W.-H., & Walrafen, G.E. 1997. Raman spectral evidence for hydration forces between collagen triple helices. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. Vo. 94, pp. 11312-11317, Oct. Biofisica.
- Majumdar, S., Weinstein, R. S. & Prasad, R. R. Application of fractal geometry techniques to the study of trabecular bone. *Medical Physics*. V. 20, N 6. Nov.- Dic. 1993
- Mann, S. 1993. Molecular tectonics in biomineralization and biomimetic materials chemistry. *Nature*. Vol.365, 7 Oct. Pp 499-505.
- Merry, J.C., Gibson, I.R., Best, S.M., & Bonfield. 1998. Synthesis and Characterization of Carbonate Hydroxyapatite. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. Vol. 9. N. 12. Pp 779-783.
- Morcillo, R. J. 1980. Espectroscopia Infrarroja. Serie Química, Monografía # 12. O.E.A. Programa regional de desarrollo científico y tecnológico.
- Morrison, R. Th. & Boyd, R. N. 1976. Química Orgánica. Fondo Educativo Interamericano.
- Muser, D. (Editor) 1992. BIOMATERIALS. Hard Tissue Repair and Replacement.
- Ozin, G.A., Varaksa, N., Coombs, N. Davies, J.E., Perovic, D.D. & Ziliox, M. 1997. Bone mimetics: a composite of hydroxyapatite and calcium dodecylphosphate lamellar phase. *J. Mater. Chem.* 7(8), 1601-1607.
- Ochoterena, I. 1945. Tratado Elemental de Histología General y de Organografía Microscópica. Ed. Botas México, D.F. 2ª Edición.
- Parker, F.S. 1983. Applications of Infrared, Raman and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry. Plenum Press. E.U.A.
- Parsche, F., & Nerlich, A.G. 1997. Suitability of Immunohistochemistry for Determination of Collagen Stability in Historic Bone Tissue. *Journal of Archaeological Science*. 24, 274-281.
- Pauling, L. 1965. Uniones Químicas. Ed. Kapelus. Buenos Aires, Argentina.
- Pauling, L. 1988. General Chemistry. Dover publications, Inc., N.Y.
- Pauling, L. & Corey, R.B. 1951. The Structure of Fibrous Proteins of the Collagen-Gellatin group. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* Pp272-281, 37, 205.

- Person, A., Bocherens, H., Saliege, J.F., Paris, F., Zeitoun, V., Gérard, M. Early Diagenetic Evolution of Bone Phosphate: An X-Ray Diffractometry Analysis. *Journal of Archaeological Science*. 1995, 22, 211-221.
- Piepenbrink, H. 1989. Examples of chemical changes during fossilisation. *Applied Geochemistry*. V. 4, pp. 273-280.
- Reyes-Gasga, J., García, C.R., Alvarez-Fregoso, O., Chávez-Carvayar, J.A. & Vargas-Ulloa, L. 1999. Conductivity in human tooth enamel. *Journal of Materials Science*. 34, 2183-2188.
- Reyes-Gasga, J., García, C.R. & Vargas-Ulloa, L. 1997. *In-situ* observations of fractals structures and electrical conductivity in human tooth enamel. *Philosophical Magazine A*. Vol. 75, N. 4, 1023-1040.
- Rivera, M. E. M. Desarrollo, descripción y análisis del método de crecimiento de hidroxiapatita (HAP) sobre geles monolíticos de sílice y procesamiento y caracterización de esferas de HAP con porosidad controlada para prótesis de globo ocular. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. Asesor: Dr. Victor Manuel Castaño Meneses. 1997.
- Rodríguez, L. J. 1986. Fundamentos de Cristalografía Física. Secretaría Gral. De la O.E.A., E.U.A.
- Rossert, J. & de Crombrughe, B. Type I Collagen: Structure, Synthesis and Regulation. En: *Principles of Bone Biology*. Editores: Bilezikian, J.P., Raisz, L. G. & Rodan, G. A. 1996.
- Ruvalcaba Sil, J.L. 1998. Estudios Arqueométricos mediante las técnicas de PIXE y RBS. Simposium Nacional de Arqueometría. San Luis Potosí, México.
- Ryzhkov, V.L. 1956 Virus Crystallization. En: *Growth of Crystals*. Shubnikov, A. V. & Sheftal, N.N. Editores. Academia de ciencias U.R.S.S.
- Sands, D.E. 1993. Introducción a la Cristalografía. Edit. Reverté. Barcelona. Esp.
- Savarino, L., Stea, S., Granchi, D., Donati, M.E., Cervellati, M., Moroni, A., Paganetto, G. & Pizzoferrato, A. X-Ray Diffraction of Bone at the interface with Hydroxyapatite-coated versus uncoated Metal Implants. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* Vol. 9. No.12 (1998).
- Suetsugu, Y. & Tanaka, J. 1999. Crystal growth of carbonate apatite using a CaCO<sub>3</sub> Flux. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 10, 561-566.
- Tatárinov, V.G. 1980. Anatomía y Fisiología Humanas. Ed. MIR, Moscú.
- The Merck Index. 1983. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Martha Windholz, Editor. Tenth edition. Merck, & Co. Inc. N.J. E.U.A.
- Tu, A.T. 1982. Raman Spectroscopy in biology: Principles and Applications. John Wiley & Sons, Publ. E.U.A.
- Vento, C. E., Rodríguez, S.R., y Franco, M. L. La datación absoluta por el Método Colágeno en Cuba. Kobie (Bilbao) Grupo Espeleológico Vizcaino. Diputación Foral de vizcaya. Boletín núm. 11. 1981.
- Viidik, A. & Vuust, J. 1980. BIOLOGY OF COLLAGEN. Academic Press. Dinamarca, Suec.
- Vaughan, J.M. 1970. The Physiology Of Bone. Clarendon Press, Oxford.
- Voet, D., & Voet, J. 1995. Biochemistry. John Wiley & Sons. E.U.A.

- Watson, J., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steitz, J.A. Weiner, A .M. 1987. *Molecular Biology Of The Gene*. 4<sup>th</sup> Ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Weiner, S. & Traub, W. 1986. Organization of Hydroxyapatite crystals within collagen fibrils. *FEBS Letters*. Vol. 206 num.2.
- Westbroek, P. & Marin, F. A marriage of bone and nacre. *Nature*. 392.30-Abril (1998).
- Wischinitzer, S. 1989. *Introduction to electron microscopy*. Maxwell Macmillan International Ed. Pergamon Press.
- Woodhead-Galloway, J. 1980. *Collagen: The Anatomy of a Protein*. Studies in Biology. No. 117. New College, Oxford, U.K.
- Wyszczanski – Minkowics, T. 1969. An Attempt at relative age determination of fossil bones by fluorine-chlorine-apatite method. *Studia Geologica Polonica*. Varsovia Vol. 28.
- Yin Hsu, F., Chueh, S., & Jiin Wang, Y. 1999. Microspheres of hydroxyapatite/reconstituted collagen as supports for osteoblast cell growth. *Biomaterials*. 20, 1931-1936.
- Yuan, H., Yang, Z., Li, Y., Zhang, X, D e Bruijn, J.D. & De Groot, K. 1998. Osteoinduction by Calcium Phosphate biomaterials. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. Vol. 9. No. 12. Dic.
- Zapanta-LeGeros, R. Effect of Carbonate on the Lattice Parameters of Apatite. *Nature*. No.4982 Abril 24, 1965.
- Zimmer, C. 2000. In Search of Vertebrate Origins: Beyond Brain and Bone. *Science*, Vol 287, 3 de marzu.

Apéndice: Índices de Miller (h, k, l).

Los índices h, k, l se basan en la orientación de los planos respecto a las direcciones cristalográficas determinadas por la celda unitaria de la correspondiente red de Bravais. Fueron propuestos por M.H. Miller en 1939, en su clásica obra "A treatise on Crystallography" (Rodríguez, 1986). Cada vector de la red se define con respecto al origen mediante un vector  $v = ua + vb + wc$ . De esta forma sólo se requieren las coordenadas u, v, w para especificar tal vector, las cuales convencionalmente se escriben como uvw. Alternativamente, los puntos en la red (o en la celda unidad) se especifican también mediante estos valores uvw (enteros o fraccionarios, positivos o negativos). Un plano que interseca a los ejes cristalográficos en las posiciones  $m00$ ,  $0n0$  y  $00p$  (ver figura A) queda totalmente definido por estas intersecciones. Es costumbre hacer uso de los valores recíprocos de las intersecciones de un plano dado en la red espacial para distinguirlo de otros planos diferentes (esto es, no paralelos); adicionalmente, los valores  $1/m$ ,  $1/n$  y  $1/p$  se convierten en los números enteros de menor magnitud posible, pero conservando las proporciones entre ellos  $(1/m):(1/n):(1/p)$ . Así, por ejemplo, si las intersecciones toman valores de  $m=2$ ,  $n=-3$  y  $p=4$ , se tiene que  $(1/m)=1/2$ ,  $(1/n)=-1/3$  y  $(1/p)=1/4$ , por lo que los números enteros más pequeños que mantienen las proporciones  $1/2 : -1/3 : 1/4$  resultan ser (al multiplicar cada uno por 12) los números 6:-4:3. Estos números se expresan en la forma (643) y se conocen como **índices de Miller**. Debe notarse que la terna de números (hkl) puede usarse para denotar tanto un solo plano como todo el conjunto infinito de planos paralelos de la misma orientación (Cabañas, 1998).

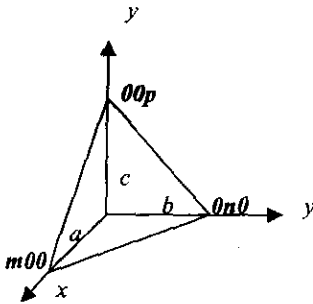


Figura A. Intersecciones de un plano con los ejes cristalográficos (Tomado de Cabañas, 1998).

#### Apéndice:Metodo Rietveld.

El método de Rietveld es un método de ajuste por el método de mínimos cuadrados de un patrón de difracción calculado con un patrón de difracción obtenido experimentalmente. El método fue propuesto originalmente por Rietveld para datos de difracción de neutrones y, posteriormente se implementó con mucho éxito en el análisis de datos de difracción de rayos X. El método de Rietveld original incluye el ajuste de parámetros estructurales de un modelo propuesto como son: coordenadas cristalográficas, factores de temperatura, y factores de ocupación.

El orden que se sigue para efectuar el refinamiento de los parámetros estructurales es

1. Coordenadas cristalográficas. Generalmente se empieza con los átomos más pesados, dejando al último los átomos ligeros.
2. Parámetros de los momentos magnéticos (en el caso de estructuras magnéticas).
3. Factores de temperatura isotrópicos.
4. Factores de temperatura anisotrópicos. Si se refinan estos parámetros, los factores de temperatura isotrópicos correspondientes se dejan en cero.
5. Factores de ocupación. No se refinan si la fase es estequiométrica y no es una aleación o solución sólida (las concentraciones -en partes por millón- no se pueden detectar mediante el ajuste de los factores de ocupación).