



**Universidad Autónoma de Querétaro**

**Facultad de Ingeniería**



**TES IS**

**DEPOSICIÓN EN FRÍO DE BIO-HIDROXIAPATITA NANOMÉTRICA DE HUESO  
TRABECULAR DE BOVINO EN TITANIO**

Que como parte de los requisitos para obtener el título de

**INGENIERO FISICO**

**Presenta:**

León Rafael Bernal Alvarez

**Dirigida por:**

**Director:**

Dr. Mario E. Rodríguez García.

**Co-directora:**

Dra. Sandra M. Londoño Restrepo.

**FECHA**

20 de mayo de 2021



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería

**DEPOSICIÓN EN FRÍO DE BIO-HIDROXIAPATITA NANOMÉTRICA DE HUESO  
TRABECULAR DE BOVINO EN TITANIO**

Opción de titulación  
**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
**INGENIERO FÍSICO**

Presenta:  
**León Rafael Bernal Alvarez**

Dirigido por:  
**Dr. Mario Enrique Rodríguez García**

Co-Directora:  
**Dr. Sandra Milena Londoño Restrepo**

Dr. Mario Enrique Rodríguez García  
**Presidente**

Dra. Sandra Milena Londoño Restrepo  
**Secretaria**

Dra. Margarita Contreras Padilla  
**Vocal**

Firma

Firma

Firma

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Mayo, 2021  
México

## RESUMEN

La hidroxiapatita es un biocerámico fundamental para los huesos de los vertebrados, debido a que es el principal componente de la fase inorgánica del tejido óseo. Este puede extraerse de diferentes fuentes orgánicas, siendo el bovino una de ellas. Asimismo, el titanio es un material biológicamente inerte utilizado en implantes odontológicos; sin embargo, para que este último no genere repercusiones a largo plazo en el sistema receptor, se opta por un recubrimiento a base de hidroxiapatita.

Pese a que se generen compósitos entre el titanio e hidroxiapatita, el recubrimiento continúa teniendo defectos durante o al final de su fabricación. Por lo que en la presente tesis se realizó un depósito en frío de hidroxiapatita de procedencia biológica (BIO-Hidroxiapatita), específicamente de bovino, en titanio quirúrgico grado 5 (Ti-6Al-4V) para obtener un buen anclaje del biocerámico en el sustrato.

Las técnicas utilizadas fueron Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR), Microscopía Digital, Dispersión Dinámica de Luz (DLS), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Microscopía Electrónica de Barrido de Alta Resolución (HR-SEM) y Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersiva (EDS).

En este trabajo se generó un buen anclaje mediante una deposición en frío de BIO-Hidroxiapatita (BIO-HAp) nanométrica limpiada con hidróxido de potasio (KOH) en Ti-6Al-4V surcado por medio de Escritura de Láser Directa (DLW). La calidad del recubrimiento viene directamente de la mano de la coalescencia de los cristales de BIO-HAp nanométrica al calcinarse a 720°C y de la rugosidad del titanio quirúrgico de grado 5, ya que al aumentar este valor, los puntos de anclajes se vuelven menos estrechos y por ende se tiene un mayor número de nanocristales dentro de cada uno de estos sitios; haciendo que al coalescer, el tamaño de partícula aumente en cada zona y por tanto tener un recubrimiento más homogéneo.

**Palabras clave:** Hidroxiapatita, bovino, Ti-6Al-4V, deposición en frío, coalescencia.

## ABSTRACT

Hydroxyapatite is a fundamental bioceramic for vertebrate bones, since it is the main component of the inorganic phase of bone tissue. This can be extracted from different organic sources, bovine being one of them. Likewise, titanium is a biologically inert material used in dental implants; However, so that the latter does not generate long-term repercussions on the receptor system, a hydroxyapatite-based coating is chosen.

Although composites are generated between titanium and hydroxyapatite, the coating continues to have defects during or at the end of its manufacture. Therefore, in the present thesis, a cold deposit of hydroxyapatite of biological origin (BIO-Hydroxyapatite), specifically of bovine, was made in surgical titanium grade 5 (Ti-6Al-4V) to obtain a good anchoring of the bioceramic in the substrate. .

The techniques used were X-ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Digital Microscopy, Dynamic Light Scattering (DLS), Scanning Electron Microscopy (SEM), High Resolution Scanning Electron Microscopy (HR-SEM) and Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS).

In this work, a good anchoring was generated by cold deposition of nanometric BIO-Hydroxyapatite (BIO-HAp) cleaned with potassium hydroxide (KOH) in Ti-6Al-4V furrowed by means of Direct Laser Writing (DLW). The quality of the coating comes directly from the coalescence of the nanometric BIO-HAp crystals when calcined at 720 ° C and from the roughness of grade 5 surgical titanium, since by increasing this value, the anchor points become less narrow and therefore there is a greater number of nanocrystals within each of these sites; causing that when coalescing, the particle size increases in each zone and therefore have a more homogeneous coating.

**Key words:** Hydroxyapatite, bovine, Ti-6Al-4V, cold deposition, coalescence.

*Dedico esta tesis a Dios, por todas las bendiciones que me ha otorgado. Mis padres y mi hermano por su apoyo y amor incondicional. Mi tía Elia y tío Ángel por brindarme un segundo hogar. Y no menos importante, a mis familiares y amigos por todos los buenos momentos.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis asesores, el Dr. Mario Enrique Rodríguez García, la Dra. Sandra Milena Londoño Restrepo y la Dra. Margarita Contreras Padilla por sus enseñanzas, consejos, tiempo y apoyo.

Al Dr. Cristian Felipe Ramírez Gutiérrez por sus enseñanzas, consejos, tiempo y apoyo.

Al Mto. Luis Fernando Zubieta Otero, Ing. Omar Mauricio Gómez Vázquez e Ing. Brandon Alexis Correa Piña por su apoyo y ayuda en la caracterización y realización de experimentos que se presentan en esta tesis.

A la Mta. Angélica Marcela Castillo Paz por su apoyo en la corrección del presente trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de radiometría por todas y cada una de las experiencias y momentos que pasamos.

A mis profesores por su guía, paciencia y conocimiento que me otorgaron a lo largo de la carrera.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por permitirme concluir mis estudios de licenciatura en Ingeniería Física.

Al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la Universidad Autónoma Nacional de México por permitirme el uso de sus instalaciones para poder llevar a cabo este proyecto.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN114320. Al CONACyT por el financiamiento (A1-S-8979).

A los académicos y técnicos por el apoyo para caracterizar las muestras que se presentan en este documento: Dra. Beatriz Millán Malo y la Dra. Carmen L. Peza Ledesma del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la Universidad Nacional Autónoma de México; al Dr. Jhon A. Villada Villalobos del Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada Unidad Querétaro; y a la Ing. Valeria Gómez de Anton Paar.

*La brevedad es el alma del ingenio.*

- William Shakespeare

*Fracasar no te da una razón para renunciar mientras tengas fe.*

- Masashi Kishimoto

*La vida es como un lápiz que seguro se acabará. Pero dejará la hermosa escritura de la vida.*

- Eiichiro Oda

## CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN .....	12
1.1	Planteamiento del problema .....	12
1.2	Justificación.....	13
2	ANTECEDENTES.....	15
2.1	Tejido óseo .....	15
2.2	Hidroxiapatita .....	22
2.2.1	BIO-Hidro xiapatita .....	22
2.2.2	Hidro xiapatita nano métrica .....	24
2.3	Titanio.....	27
2.3.1	Tratamiento del titanio .....	31
2.4	Deposición de hidroxiapatita en titanio .....	33
2.5	Técnicas de caracterización.....	36
2.5.1	Difracción de Rayos X (DRX).....	36
2.5.2	Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	45
2.5.3	Microscopía digital .....	47
2.5.4	Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	48
2.5.5	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	50
2.5.6	Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersiva (EDS) .....	52
3	HIPÓTESIS.....	54
4	OBJETIVOS .....	55
4.1	Objetivo general.....	55
4.2	Objetivos particulares.....	55
5	MATERIALES Y METODOLOGÍA .....	56
5.1	Materiales.....	56
5.2	Metodología .....	56
5.2.1	Metodología 1 (Nano BIO-Hidro xiapatita) .....	56
5.2.1.1	Obtención de polvo de BIO-Hidro xiapatita .....	56
5.2.1.1.1	Limpieza primaria .....	57
5.2.1.1.2	Trituración, molienda y tamizado .....	58
5.2.1.2	Obtención de BIO-Hidro xiapatita nanométrica .....	58
5.2.1.2.1	Limpieza secundaria .....	59
5.2.1.2.1.1	Limpieza alcalina .....	59
5.2.1.2.1.2	Sonicación .....	60
5.2.2	Metodología 2 (Grabado en titanio).....	61
5.2.3	Metodología 3 (Recubrimiento de titanio con nano BIO-Hidro xiapatita) .....	63
5.3	Técnicas de caracterización.....	64



5.3.1	Difracción de rayos X (DRX) .....	66
5.3.2	Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	67
5.3.3	Microscopia Digital .....	68
5.3.4	Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	68
5.3.5	Microscopia electrónica de barrido (SEM) .....	69
5.3.6	Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersiva (EDS) .....	71
6	RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	72
6.1	Difracción de rayos X (DRX).....	72
6.2	Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) .....	76
6.3	Microscopía Digital.....	79
6.4	Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	80
6.5	Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	82
6.6	Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersiva (EDS) .....	88
7	CONCLUSIONES .....	95
8	REFERENCIAS .....	97
9	ANEXOS .....	110
9.1	Publicación.....	110

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Sistema esquelético humano .....	16
Figura 2.2. Diferentes tipos de huesos .....	17
Figura 2.3. Hueso cortical y trabecular .....	18
Figura 2.4. Porosidad primaria del hueso trabecular .....	18
Figura 2.5. Microarquitectura ósea .....	19
Figura 2.6. Estructura jerárquica del hueso .....	20
Figura 2.7. Osteoblastos, osteocitos y osteoclastos .....	21
Figura 2.8. Patrón de difracción de rayos X de polvo de hueso de bovino .....	25
Figura 2.9. Perfiles térmicos de HAp enfriada por diferentes métodos .....	26
Figura 2.10. FWHM de HAp .....	27
Figura 2.11. Implantes de titanio y su inserción en la boca .....	28
Figura 2.12. Imagen de SEM de TiO <sub>2</sub> obtenido por sol-gel .....	29
Figura 2.13. Perdida periimplantaria .....	30
Figura 2.14. Radiografía de una periimplantitis con perdida ósea importante .....	30
Figura 2.15. Patrón jerárquico DLW-DLIP en titanio .....	31
Figura 2.16. Ensayo de adhesión bacteriana sobre superficie de titanio .....	32
Figura 2.17. Implante de titanio tratado por ablación .....	33
Figura 2.18. Esquema del método de rocío pirolítico .....	34
Figura 2.19. Esquema del método de pulverización en frío .....	34
Figura 2.20. Deposición electroforética .....	36
Figura 2.21. Radiografía tomada por Röntgen .....	37
Figura 2.22. Espectro de radiación de Mo en función del voltaje aplicado .....	38
Figura 2.23. Transición electrónica en el átomo .....	39
Figura 2.24. Variación con la longitud de onda de la energía por cuanto de rayos X y coeficiente de absorción del níquel .....	40
Figura 2.25. Diferencia entre un espectro con filtro y uno sin filtro .....	41
Figura 2.26. Vista interior de un tubo de rayos X .....	42
Figura 2.27. Ánodos giratorios .....	42
Figura 2.28. Esquema de un difractometro de rayos X .....	43

Figura 2.29. Representación gráfica de la Ley de Bragg .....	44
Figura 2.30. Patrón típico de hueso bovino desengrasado y desproteinizado .....	45
Figura 2.31. Esquema del interferómetro de Michelson .....	46
Figura 2.32. Espectro infrarrojo del poliestireno .....	47
Figura 2.33. Esquema del microscopio digital .....	48
Figura 2.34. Esquema del funcionamiento de DLS .....	49
Figura 2.35. Ejemplo del patrón moteado .....	49
Figura 2.36. DLS de partículas grandes y partículas pequeñas .....	50
Figura 2.37. Esquema del funcionamiento de SEM .....	52
Figura 2.38. Esquema de un equipo de EDS conectado a un instrumento de microscopía electrónica .....	53
Figura 5.1. Diagrama de flujo de obtención de BIO-HAp .....	57
Figura 5.2. Limpieza primaria de BIO-HAp .....	58
Figura 5.3. Obtención de polvo de BIO-HAp .....	58
Figura 5.4. Diagrama de flujo de obtención de agregados nanométricos de BIO-HAp .....	59
Figura 5.5. Limpieza alcalina .....	60
Figura 5.6. Obtención de BIO-HAp nanométrica .....	61
Figura 5.7. Diagrama de flujo de obtención de los surcos en el titanio .....	62
Figura 5.8. Línea seguida por el láser HANS modelo YLP-MDF-152 sobre el titanio .....	62
Figura 5.9. Láser HANS YLP-MDF-152 .....	63
Figura 5.10. Diagrama de flujo del recubrimiento de titanio con nano BIO-HAp .....	64
Figura 5.11. Recubrimiento de nano BIO-HAp en titanio .....	64
Figura 5.12. Difractómetro de rayos X marca Rigaku modelo Ultima IV .....	67
Figura 5.13. Espectrofotómetro FT-IR-ATR marca Perkin modelo Spectrum Two .....	67
Figura 5.14. Microscopio Digital Olympus DSX510 .....	68
Figura 5.15. Analizador de partículas marca Anton Paar modelo Litesizer 500 .....	69
Figura 6.16. Microscopio electrónico de barrido, JEOL JSM-6060 LV .....	69
Figura 5.17. Microscopio electrónico de barrido, JEOL JSM-7401 F .....	70
Figura 5.18. Microscopio electrónico de barrido, Hitachi SU8230 .....	71
Figura 6.1. Difractograma de titanio quirúrgico grado 5 .....	73

Figura 6.2. Difractograma de las muestras: B-RAW y B-KOH .....	74
Figura 6.3. Difractograma de las muestras: B-KOH-10, B-KOH-20, B-KOH-30 y B-KOH-60 .....	75
Figura 6.4. Calculo de FWHM del plano (002) de todas las muestras de BIO-HAp .....	76
Figura 6.5. Espectros de infrarrojo de HAp B-RAW y B-KOH .....	77
Figura 6.6. Aumento de la rugosidad del Ti-6Al-4V tratado .....	79
Figura 6.7. Diámetro de de partícula de B-KOH-10, B-KOH-20, B-KOH-30 y B-KOH-60 .....	81
Figura 6.8. Imágenes de HR-SEM del titanio tratado .....	83
Figura 6.9. Imágenes de SEM de B-RAW y B-KOH .....	84
Figura 6.10. Imágenes de HR-SEM de B-KOH-10, B-KOH-20, B-KOH-30 y B-KOH-60 .....	86
Figura 6.11. Imágenes de HR-SEM de los compósitos entre nano BIO-HAp y el Ti-6Al-4V .....	88
Figura 6.12. EDS de la muestra Ti HAp02 .....	90
Figura 6.13. EDS de la muestra Ti HAp03 .....	92
Figura 6.14. EDS de la muestra Ti HAp04 .....	94

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 5.1. Muestras que se caracterizarón .....	65
Tabla 6.1. Posiciones de las bandas de FT-IR en hidroxiapatita.....	78
Tabla 6.2. Rugosidad respectiva para cada muestra de Ti-6Al-4V .....	80

Dirección General de Bibliotecas UAQ

# 1 INTRODUCCIÓN

Las deposiciones de cerámicos en metales llevan realizándose desde 1806 (Naylor et al., 1992), teniendo resultados buenos y malos según los materiales que se utilicen en el compuesto. Sin embargo, la utilización de biocerámicos de un tiempo más reciente y su crecimiento actual en el área, ha llevado a la creación de prótesis e implantes revolucionarios en la ciencia, tecnología y medicina. Esto se debe a gran medida a que la mayoría de estos tipos de cerámicos tienen buena biocompatibilidad en los diferentes medios con los cuales entra en contacto. Uno de los más estudiados es la hidroxiapatita; y esta puede ser natural o sintética. La natural lleva el nombre de BIO-Hidroxiapatita (BIO-HAp), la cual se diferencia de la hidroxiapatita sintética (HAp-Sint), proviene de una fuente biológica (como lo puede ser el hueso tal cual y lo mencionan Londoño-Restrepo, Jeronimo-Cruz, Rubio-Rosas & Rodríguez-García (2018)), mientras que la segunda se obtiene por medio de métodos de síntesis química. Sin embargo, la gran diferencia es que la BIO-HAp contiene iones importantes para la regeneración ósea, en tanto que a la HAp-Sint se le tienen que incorporar. A pesar de ello en la práctica esto no se efectúa.

La BIO-Hidroxiapatita sufre problemas en su anclaje al ser depositada en algún metal (los que más se utilizan para este proceso son los metales inertes), lo que genera que el recubrimiento tenga una falta de adhesión cuando se es aplicado. Esto ha llevado a los investigadores a innovar en nuevos métodos de deposición.

## 1.1 Planteamiento del problema

En los Estados Unidos Mexicanos existen 6,689,802 de personas que sufren alguna discapacidad, de las cuales solamente 4,527,784 especifican de que tipo (INEGI, 2010). Dentro del sector en el que no se indica el tipo de inhabilidad, se encuentran las personas con problemas odontológicos, por lo que no se tienen contabilizados el número de personas que tienen implantes dentales en el país o que necesitan alguno. No obstante, el hecho de que esta estadística no exista en los registros del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) es preocupante para los individuos que padecen este tipo de minusvalía, ya que no se le está dando la atención necesaria. Haciendo que los implantes o cirugías que utilizan biocerámicos

de compuestos de calcio se importen a un alto costo, creando una dependencia a otros países para subsanar estos biomateriales (UNAM, 2002). Lo que implica que sea poco accesible para gran parte de la población mexicana.

Por otro lado, el número de rastros en México es muy grande (INEGI, 2015), por ende hay mucha materia prima para trabajar en implantes odontológicos a base de hidroxiapatita natural, principalmente extraída de los bovinos. Esto es debido a que México es el séptimo consumidor y octavo productor de esta materia prima a nivel mundial (COMECARNE, 2019). Tanto es la necesidad de éste en la república, que en el año 2019 se sacrificaron 8,245,000 de bovinos en los rastros mexicanos según la COMECARNE (2019)

Los biomateriales metálicos, actualmente son hechos de titanio, acero inoxidable, Vitallium y otras aleaciones o compuestos, que si bien no son cien por ciento no tóxicos para el ser humano, después de cierto tiempo pueden introducir partículas corroídas, las cuales se desprenden de la superficie del material por la continua exposición de este con fluidos corporales (haciendo referencia totalmente a las biomateriales basados en cualquier tipo de metal), al cuerpo a pesar de que se consideren biológicamente inertes (Lewis et al., 2018).

## **1.2 Justificación**

El beneficio del uso de materiales de procedencia biológica, como lo son los huesos de los animales, para la fabricación de biomateriales que puedan ser utilizados en aplicaciones odontológicas, es el evitar afectar el organismo al cual será implantado; ya que el uso de implantes dentales convencionales (a base únicamente de metales) a la larga generan corrosión en el metal.

La ventaja de utilizar huesos de bovino es que en México se cuentan con gran número de rastros y establecimientos dedicados a venta de materiales orgánicos de donde se puede obtener BIO-Hidroxiapatita, además de la cantidad de bovinos ascendió más de 8,000,000 en el 2019 (COMECARNE, 2019) por lo que es redituable para la extracción de BIO-HAp. Por lo que es rentable.

Se recomienda el uso de nano hidroxiapatita puesto que el sistema óseo está compuesto por una nano, micro y macro estructura (Londoño-Restrepo, Ramirez-Gutierrez, Villarraga-

Gómez & Rodríguez-García, 2019), por lo que al generar la configuración más pequeña (nano estructura) se da inca pie a que el biocerámico pueda ser aceptado de mejor manera.

La importancia del desarrollo de un método de deposición en frío de nano BIO-HAp extraída de hueso de bovino y depositarla sobre un sustrato de titanio, preferentemente de grado quirúrgico, para evitar el contacto entre el organismo receptor y el metal; es debido a que existen varios trabajos en donde se deposita hidroxiapatita en este material (titanio), las más comunes son la pulverización en frío (Lee et al., 2013) y la deposición electroforética (Kollath et. al., 2013); sin embargo, estos métodos generarían riesgos al momento de una aplicación odontológica por la baja calidad del depósito en el sustrato. No obstante, esta nueva técnica podría evitar estos contratiempos.



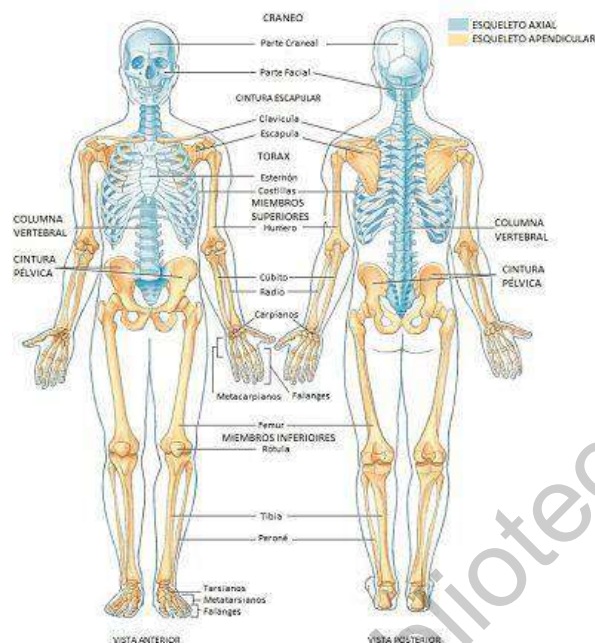
## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Tejido óseo

El tejido óseo está compuesto en un 70% por fase mineral de la cuál un 80% es hidroxiapatita carbonatada, el 15% carbonato de calcio, el 5% restante son fases minoritarias (algunas de las cuales son fosfato dibásico de calcio, fosfato dicálcico y fosfato tricálcico) e iones de sustitución como el magnesio (Mg), potasio (K), nitrógeno (N), entre otros (Londoño-Restrepo, Jeronimo-Cruz, Rubio-Rosas & Rodriguez-García, 2018). A su vez, es parte fundamental del aparato locomotor, lo que permite la movilidad. Además de estar constituido por el sistema esquelético que asimismo se compone de órganos llamados huesos (Welsch & Sobotta, 2008).

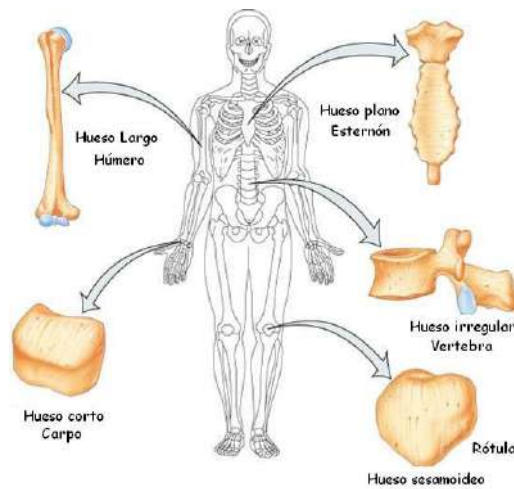
De igual manera, el tejido óseo, está compuesto de fases orgánicas (20%) que le proporcionar fuerza y resiliencia al hueso, lo cual hace que esté pueda recibir impactos sin fracturarse; estas son lípidos, proteínas no colágenas y colágeno tipo I, donde el último aporta el 90% de esta fase. Sin embargo, los minerales no se unen directamente con la parte orgánica del hueso, más bien lo hacen a través de la unión celular y sitios activos para la mineralización que son proporcionadas por las proteínas no colágenas (Londoño-Restrepo, Ramirez-Gutierrez, Villarraga-Gómez & Rodriguez-García, 2019).

El esqueleto, se compone de 206 huesos en un adulto humano, lo que representa aproximadamente el 12% del peso total del cuerpo, que a su vez se divide en el esqueleto axial y en esqueleto apendicular (Drake, Vogl & Mitchell, 2019), como se puede observar en la *Figura 2.1*. Donde el primero es la parte del esqueleto que consta del tronco y los huesos que están ubicados cerca o a lo largo del eje central del cuerpo (White, et al., 2011); mientras que el segundo consiste de los hueso que sostienen las apéndices además de los elementos esqueléticos dentro de las extremidades (Manton, et al., 2019). Por lo tanto, el esqueleto es el punto de sujeción de los músculos y protege a los órganos como soporte estructural (Londoño-Restrepo, Ramirez-Gutierrez, Villarraga-Gómez & Rodriguez-García, 2019).



**Figura 2.1.** Sistema esquelético humano, donde de color azul se puede observar el esqueleto axial y de color naranja el esqueleto apendicular (Zabalveytia, s.f.).

Los huesos poseen una arquitectura ligera, son resistentes a la tracción y compresión, además de tener cierta elasticidad. Por sus propiedades es un material que se remodela de manera continua y es bien irrigado, es heterogéneo y altamente anisótropo (Ross & Pawlina, 2007). Estos están divididos en tres zonas, las cuales son la diáfisis (parte central), la epífisis (parte externa del hueso) y la metáfisis (parte que se encuentra entre la diáfisis y la epífisis), un ejemplo de este tipo de huesos es el fémur (Londoño-Restrepo et al., 2019). Se clasifican en cinco grupos principales según su forma: los que tienen dos epífisis y una diáfisis, es decir con una longitud mayor a las otras dimensiones, se les conoce como huesos largos (los metacarpianos y la tibia), los huesos como el carpo que tiene sus tres dimensiones similares, son los huesos cortos, los huesos planos como el esternón son delgados y anchos, las vértebras al no poder entrar en las tres clasificaciones anteriores se les conoce como huesos irregulares, mientras que los huesos sesamoideos son los que están incluidos en los tendones, como la rótula (Ross & Pawlina, 2007) (Figura 2.2).



**Figura 2.2.** Diferentes tipos de huesos (Rosales, s.f.).

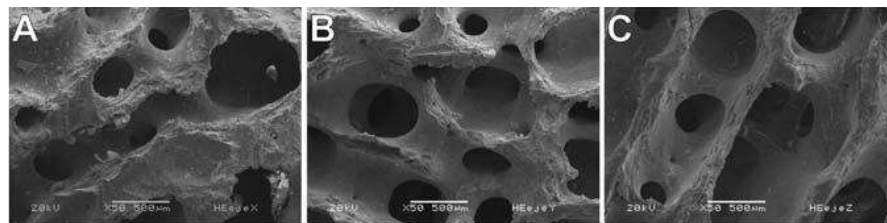
Por lo tanto, los huesos más grandes son los que resguardan a los músculos con más activación física, es decir, los que están asociados con saltar, correr o en general, con los movimientos altos (Londoño-Restrepo, Ramírez-Gutierrez, Villarraga-Gómez & Rodríguez-García, 2019).

El sistema óseo se compone de dos tipos de huesos, el trabecular y cortical, en donde el primero tiene mayor tamaño de poro que el segundo, ya que están en el orden de micras a milímetros (Londoño-Restrepo, Ramírez-Gutierrez, Villarraga-Gómez & Rodríguez-García, 2019). El hueso compacto (hueso cortical) es el que rodea al hueso trabecular y a su vez la capa externa de todos los huesos, mientras que el hueso esponjoso (hueso trabecular) encierra las cavidades que contienen células formadoras de sangre en forma de trabéculas (Drake, Vogl & Mitchell, 2019) (Figura 2.3).



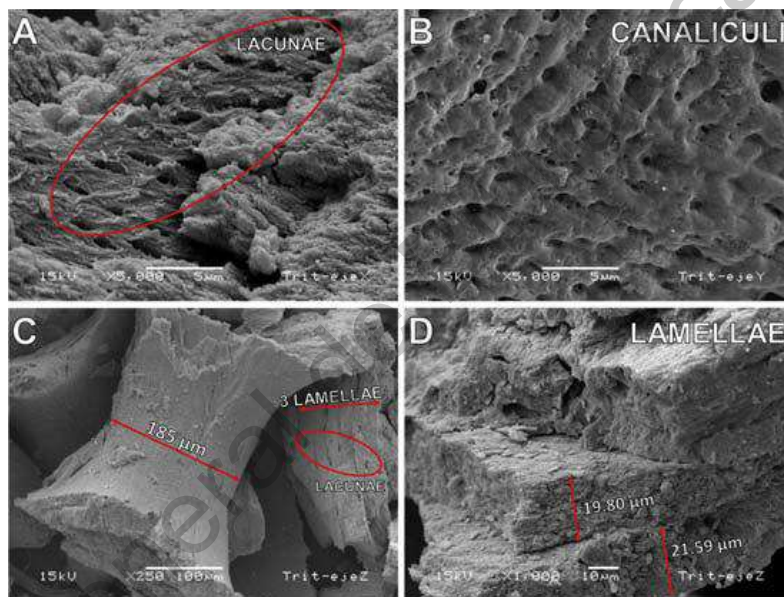
**Figura 2.3.** Hueso cortical (compacto) y trabecular (esponjoso) (Zubieta, 2020).

Es bien conocido que el hueso esponjoso tiene una actividad metabólica mayor que el hueso cortical. La resistencia mecánica está directamente relacionada con el peligro de que se genere una fractura, esto se debe a que el hueso trabecular, en huesos grandes, distribuye la carga por el hueso compacto; un ejemplo es la cabeza del fémur, la cual genera esta distribución, ya que este es considerado como un hueso grande, es decir, el hueso esponjoso se encuentra entre la epífisis y la metáfisis. A su vez, las propiedades mecánicas dichas con anterioridad dependen de la macroarquitectura y la orientación cristalinas de las trabéculas (Londoño-Restrepo, Ramirez-Gutierrez, Villarraga-Gómez & Rodriguez-García, 2019). De igual manera, tiene poros que proporcionan la porosidad primaria lo que permite la irrigación en la sangre, esto quiere decir que existen microagujeros por los cuales atraviesan los vasos sanguíneos (Ural & Vashishth, 2007) (Figura 2.4), a su vez la microporosidad beneficia la osteogénesis y por ende proporcionan un área superficial grande que permite la adhesión de los osteoblastos, mientras que el crecimiento óseo se mejora por la macroporosidad (Woodard et al., 2007).



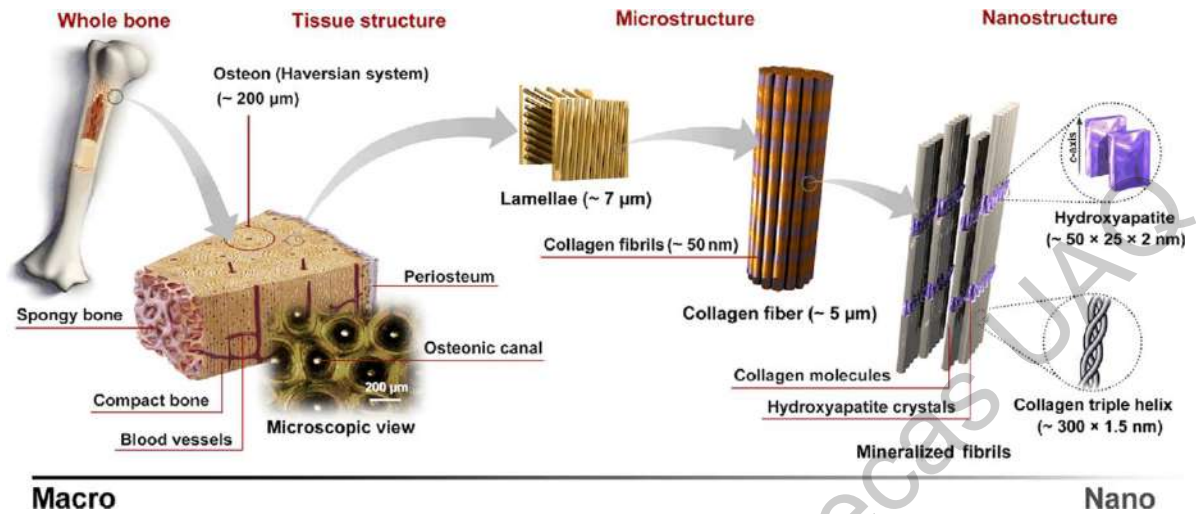
**Figura 2.4.** Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM por sus siglas en inglés) de la porosidad primaria del hueso trabecular (Londoño-Restrepo et al., 2019).

Las cavidades lacunares en el hueso esponjoso, son el lugar en donde se encuentran los osteositos (*Figura 2.5A*), éstas están relacionadas directamente con la porosidad secundaria del hueso trabecular; sin embargo, al detallar el análisis se puede observar una porosidad terciaria debido al espacio entre los nanocristales y la presencia de canaliculos (*Figura 2.5B*). Refiriéndose a la microarquitectura, las trabéculas tienen un diámetro de entre 150 a 200  $\mu\text{m}$ , por lo que su zona central es estrecha (*Figura 2.5C*), lo que genera el hábito de crecimiento preferencial de estructura laminar con diámetros aproximados de 20  $\mu\text{m}$  (*Figura 2.5D*) (Londoño-Restrepo et al., 2019).



**Figura 2.5.** Imágenes de SEM de la microarquitectura ósea; porosidad secundaria y terciaria (Londoño-Restrepo et al., 2019).

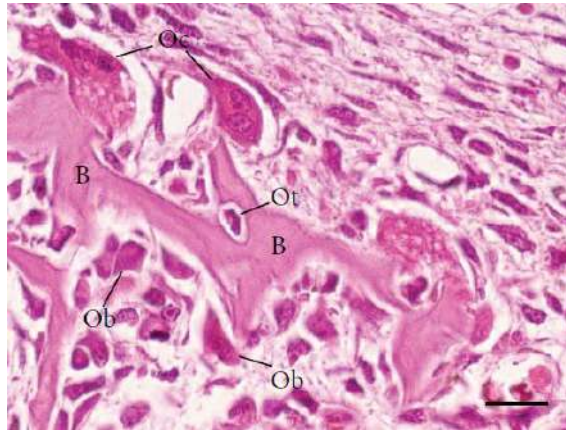
Los niveles jerárquicos del hueso están diseñados para diversas funciones, una de las cuales es para que los nanocristales de hidroxiapatita (HAp) carbonatada se alineen con las fibras de colágeno y de esta manera organizar las capas paralelas concéntricas llamadas láminas, que se encuentran alrededor de los vasos sanguíneos formando osteonas. Las osteonas son densamente empaquetadas formando el hueso cortical o compacto, por otro lado el hueso trabecular es construido en base a una red esponjosa con baja densidad ósea (Olszta et al., 2007) (*Figura 2.6*).



**Figura 2.6.** Diferentes niveles de longitud de la estructura jerárquica del hueso (Sadat-Shojai et al., 2013).

En el hueso se encuentran tres células de mucha importancia para el sistema óseo, que son los osteoblastos, osteoclastos y osteocitos (Young, O'Dowd, Woodford, 2006), en donde los primeros miden entre 20 y 30 μm (Hernández-Gil, et al., 2006), los segundos en el orden de las 100 μm (Basle, et al., 1988) y por último los osteocitos miden entre 5 y 20 μm (Tanaka-Kamioka, Kamioka, Ris & Lim, 1998) (Figura 2.7). Esto es de mucha importancia ya que al momento de que el implante entre en contacto, la hidroxiapatita debería de tener un tamaño aproximado de 10 μm o más (Lee et al., 2013).





**Figura 2.7.** Se puede observar una Micrografía de luz de una sección teñida de hematoxilina-eosina de una porción de hueso alveolar de ratas mostrando una porción de trabéculas óseas (B), en donde alcanzamos a ver los osteoblastos (Ob), osteocitos (Ot) y osteoclastos (Oc) (Florencio-Silva, Sasso, Sasso-Cerri, Simões & Cerri, 2015).

Además de las células óseas, el hueso está compuesto de una matriz orgánica, una matriz celular y una matriz mineral (inorgánica), las que lo ayudan a que este pueda poseer una función metabólica central (Welsch & Sobotta, 2008).

La matriz orgánica se conforma de células y sustancia extracelular, en donde las primeras solamente representan el 2%, mientras que la segunda forma el 98% que a su vez se conforma de un 30% de materia orgánica y un 70% de sustancias inorgánicas ricas en fósforo y calcio (Ross & Pawlina, 2007) (Figura 2.6).

Al igual que la matriz orgánica, la matriz celular se compone de células, específicamente los osteocitos, osteoblastos y osteoclastos; sin embargo, lo que caracteriza a esta matriz son canaliculos, es decir, prolongaciones de los osteocitos en túneles estrechos que se conectan con lagunas óseas generando una red que se conecta a osteocitos vecinos, para generar un túnel laminado que se enlaza a osteoclastos u osteoblastos, a este sistema de túneles se le conoce como sistema de Havers (ver Figura 2.3) (Ross & Pawlina, 2007).

Por último, la matriz mineral se integra de abundantes sales cristalinas, particularmente de HAP y carbonato (Welsch & Sobotta, 2008).

## 2.2 Hidroxiapatita

Teniendo en cuenta que la hidroxiapatita tiene gran presencia en el sistema óseo, se ha estudiado que es un mineral con estructura hexagonal y monoclinica pseudo hexagonal que pertenece a la familia de las apatitas, a su vez esta exhibe la siguiente formula general:  $A_5(BO_4)_3(OH, F, Cl)$ , en donde la A representa un catión metálico (como por ejemplo calcio, bario, sodio, entre otros) y la letra B puede ser fósforo, vanadio o arsénico. Por lo tanto el grupo de la familia de las apatitas se compone por fosfatos, arseniatos y vanadatos (Gómez Ortega, Elizondo Villareal & Guerrero Villa, 2004).

### 2.2.1 BIO-Hidroxiapatita

Conociendo como fórmula química  $Ca_5(PO_4)_3OH$  para la hidroxiapatita estequiométrica con una estructura de base  $Z=2$  y una relación de Ca/P igual a 1.667. Mientras que la HAp que proviene de los huesos de mamíferos, no posee tal estequiometría y es llamada “BIO-Hidroxiapatita” (BIO-HAp) (Giraldo-Betancur et al., 2013) y su relación Ca/P varía de 1.8 a 3 (Londoño-Restrepo, Ramirez-Gutierrez, Villarraga-Gómez & Rodriguez-García, 2019). La BIO-Hidroxiapatita es una apatita no estequiométrica, esto se debe a que de fuentes naturales se obtienen sustituciones iónicas. Los grupos fosfato e hidroxilo pueden ser reemplazados por los grupos carbonato y los halógenos, respectivamente. El alto punto de fusión ( $1500^{\circ}C$ ), ser un cerámico duro y permitir la sustitución parcial o completa en la red con similar relación atómica se justifica por su carácter iónico (Londoño-Restrepo, Ramirez-Gutierrez, Villarraga-Gómez & Rodriguez-García, 2019).

Por su parte, el hueso en polvo se compone de policristales nanométricos de HAp que se infunden dentro de la grasa y proteína (matrices orgánicas). El recubrimiento amorfo de la superficie del material equivaldría a los lípidos, mientras que las nanofibras a las proteínas. Sin embargo, cuando el hueso esta crudo no es posible ver los nanocristales de hidroxiapatita, en cambio, después de algún proceso de limpieza como lo es el tratamiento hidrotermal, el cual involucra presión y temperatura, es posible ver los cristales de hidroxiapatita en la superficie (Londoño-Restrepo, Ramirez-Gutierrez, del Real, Rubio-Rosas & Rodriguez-García, 2016).



Uno de los tratamientos hidrotermales más utilizados, es la hidrólisis alcalina hidrotérmica que mediante temperatura y reacción química de una molécula de agua se rompen varios enlaces químicos (para el caso de la hidroxiapatita es un ion hidróxido,  $\text{OH}^-$ ) y de esta manera convertir la materia orgánica sólida a líquida facilitando su eliminación, por lo que es de suma importancia tener el  $\text{OH}^-$  libre para cambiar los grupos funcionales, romper y modificar la química superficial a través del ion libre que interactúa con las moléculas (Barakat et al., 2009; Gousterova et al., 2003).

En la hidroxiapatita nanopolicristalina se aprecia una orientación preferencial en los huesos naturales, a su vez es bien sabido que los policristales pueden presentar coalescencia, es decir, transformarse en cristales individuales cuando se superan los  $720^\circ\text{C}$  (Londoño-Restrepo, Jeronimo-Cruz, Rubio-Rosas & Rodriguez-García, 2018).

Por lo tanto, dependiendo de las técnicas de extracción utilizadas, velocidad de calentamiento, tiempo de sinterización, temperatura de recorrido, velocidad de enfriamiento y la naturaleza del hueso, serán las características fisicoquímicas y la eficiencia de extracción de la BIO-HAp, ya que están altamente relacionadas (Ramirez-Gutierrez, Palechor-Ocampo, Londoño-Restrepo, Millán-Malo & Rodriguez-García, 2016). Por lo general, los cristales de HAp sinterizada muestran tamaños de cristal de apatita más grandes que los de sistemas biológicos (Londoño-Restrepo, Ramirez-Gutierrez, Villarraga-Gómez & Rodriguez-García, 2019).

Sin embargo, la sonoquímica a través de la compresión del efecto del ultrasonido para la formación de cavitación acústica en líquidos mejora en la solución la actividad química (Suslick, 1990), por lo que es un método eficaz para la obtención y crecimiento de la hidroxiapatita (Kim & Saito, 2001; Rouhani, Taghavinia & Rouhani, 2010).

La materia orgánica se degrada a temperaturas superiores a los  $450^\circ$ . En cambio, a mayores temperaturas, la BIO-HAp tiene un proceso de deshidroxilación que hace que se convierta en otras fases cristalinas (Londoño-Restrepo, Jeronimo-Cruz, Rubio-Rosas & Rodriguez-García, 2018). Al tener propiedades fisicoquímicas similares a las humanas se utiliza para aplicaciones médicas, pero estas se limitan al reemplazo directo por tener una baja resistencia

mecánica. Este biocerámico se une de manera circundante con el tejido óseo para promover el crecimiento de tejido nuevo y la integración del material. Sus principales usos en el área médica son ser utilizada como material de relleno, en cirugía maxilofacial, recubrimiento de prótesis metálicas, entre otros; donde todas las mencionadas tienen en común el nulo requerimiento de resistencia mecánica (Londoño-Restrepo, Ramirez-Gutierrez, Villarraga-Gómez & Rodriguez-García, 2019).

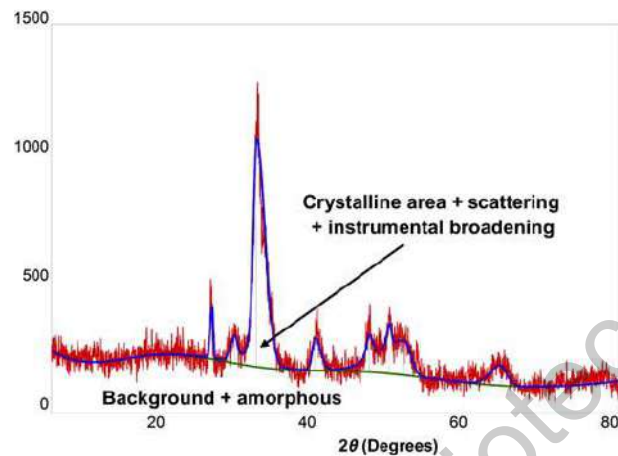
### 2.2.2 Hidroxiapatita nanométrica

La hidroxiapatita en forma nanométrica (10 – 100 nm) tiene reactividad superficial y estructura ultrafina que hace que sea mejor que la de tamaños micrométricos (>1 µm), ya que la primera ayuda a la interacción de tejido-injerto cuando se implanta el material, además de que fomenta la deposición mineral, diferenciación de osteoblastos, proliferación, genera más adherencia a diferencia de la HAp micrométrica y promueve la osteointegración (Nasiri-Tabrizi, Fahami & Ebrahimi-Kahrizangi, 2014), es decir, “la conexión estructural y funcional directa entre el hueso vivo y la superficie de un implante artificial que soporta carga” (Bra-nemark, 1986). Por estas razones se requieren poros de menos de 50 µm de diámetro para que se pueda garantizar la penetración de tejido fibrovascular y la interconexión de poros (Thuault et al., 2014). Esto nos lleva a que la BIO-HAp utilizada en implantes médicos debe tener de un 60% a un 80% de cristalinidad como lo mencionan Giraldo-Betancur et al. (2013) al estudiar esta propiedad de diversas BIO-Hidroxiapatitas comerciales. Este cálculo viene dado de la ecuación (1), en donde %C es el porcentaje de cristalinidad,  $C_A$  el área cristalina bajo el patrón de difracción,  $N$  como el ruido electrónico característico del sistema y  $TA$  el área total (Londoño-Restrepo, Ramirez-Gutierrez, Villarraga-Gómez & Rodriguez-García, 2019).

$$\%C = \frac{C_A}{TA - N} \quad (1)$$

Londoño-Restrepo et al. (2019) analizaron una muestra de BIO-HAp en crudo hecha polvo de hueso cortical de bovino, donde observaron su patrón característico de difracción (*Figura 2.8*), en la que el área amorfa y el ruido electrónico se encuentran debajo de la línea verde;

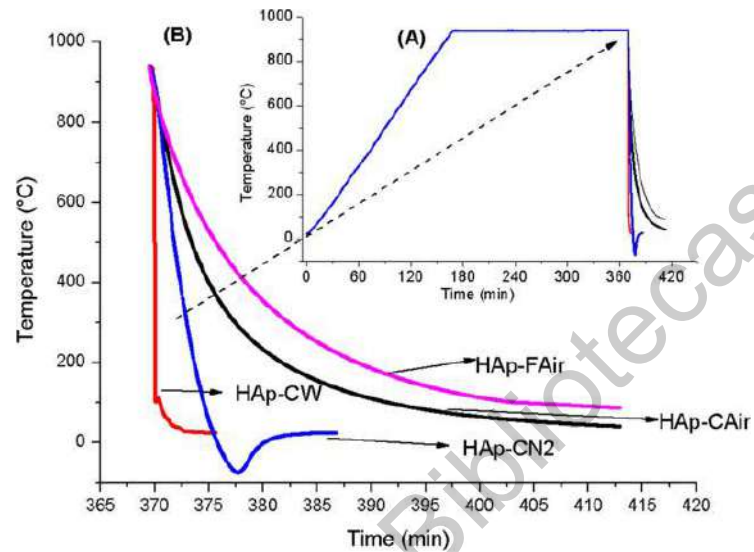
sin embargo, la parte cristalina de los nanocristales se ubica sobre esta misma, a su vez los picos difractados son cubiertos por la línea azul.



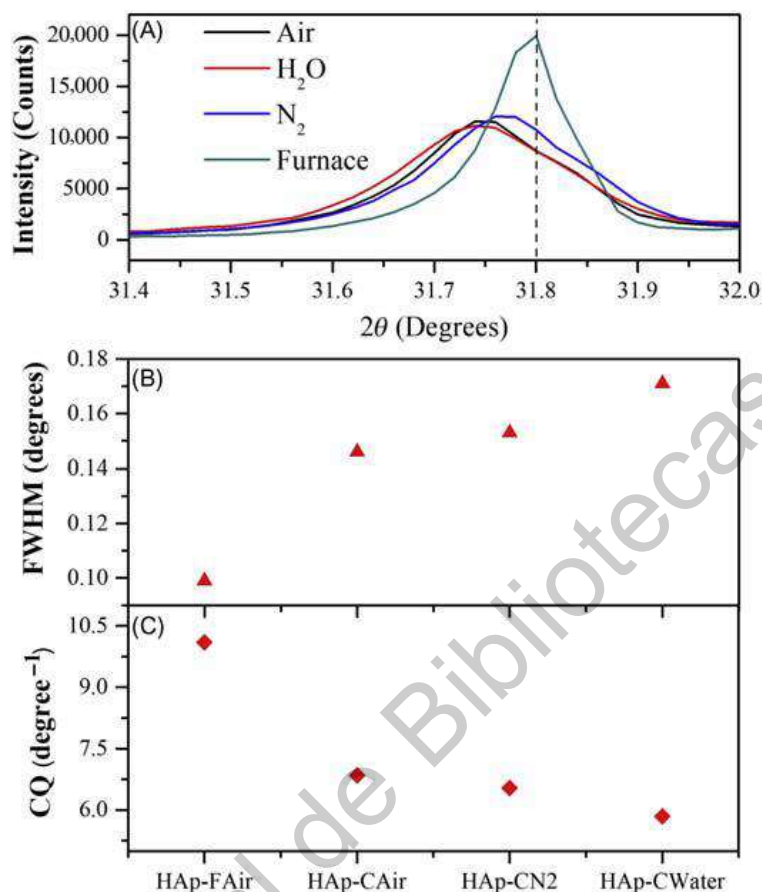
**Figura 2.8.** “Patrón de difracción de rayos X de polvo de hueso de bovino” (Londoño-Restrepo et al., 2019).

A pesar de esto, la BIO-Hidroxiapatita nanocrystalina obtenida de huesos de mamíferos no actúa de la misma manera, lo que sucede es que los nanocristales del material se comportan como rejillas de difracción en el momento que la radiación interactúa con el biocerámico, este fenómeno genera amplios picos de difracción que parecen curvas en vez de patrones (Londoño-Restrepo et al., 2019). El cuál es el caso del análisis producido por Ramirez-Gutierrez et al., (2016) en donde se estudió como la velocidad de enfriamiento afecta las propiedades estructurales de hueso cortical de bovino incinerado a 940°C que posteriormente se enfrió en nitrógeno líquido (HAp-CN2), agua fría (HAp-CW), dentro del horno (HAp-FAir) y aire (HAp-CAir), tal cual y se muestra en la *Figura 2.9*; en el que uno de los estudios fue el pico de difracción (211), en el cual se puede observar de manera gráfica la conclusión de dada por Londoño-Restrepo et al., (2019) (*Figura 2.10A*). A demás de este análisis, Ramirez-Gutierrez et al., (2016) estudiaron la calidad cristalina (CQ por sus siglas en inglés) del pico (211), ya que normalmente se utiliza el más intenso para el cálculo de la anchura a media altura (FWHM, full width at half maximum) que es con la que se determina la CQ; en donde sí el FWHM disminuye, la calidad cristalina aumenta y viceversa (Londoño-Restrepo et al., 2019). Por lo que en la *Figura 2.10B* corresponde al cambio del valor del FWHM y la

Figura 2.10C la inversa de este parámetro, a su vez se argumenta que al calcinarse los cristales de BIO-HAp es cómo fue posible realizarse el cálculo (Ramirez-Gutierrez, et al., 2016).



**Figura 2.9.** “(A) Muestra los perfiles térmicos característicos utilizados para obtener las muestras calcinadas a 5.5 C / min para la temperatura de calentamiento e isoterma a 940 C, (B) muestra las velocidades de enfriamiento para cada una de las muestras estudiadas” (Ramirez-Gutierrez, Palechor-Ocampo, Londoño-Restrepo, Millán-Malo & Rodríguez-García, 2016).



**Figura 2.10.** “(A): Muestra el pico [211] para todas las muestras estudiadas, la línea de trazos vertical representa la posición del pico [211] para HAp pura, (B) muestra los valores de FWHM para este pico y (C) muestra la inversa de FWHM (calidad de cristalinidad)” (Ramirez-Gutierrez, Palechor-Ocampo, Londoño-Restrepo, Millán-Malo & Rodríguez-García, 2016).

### 2.3 Titanio

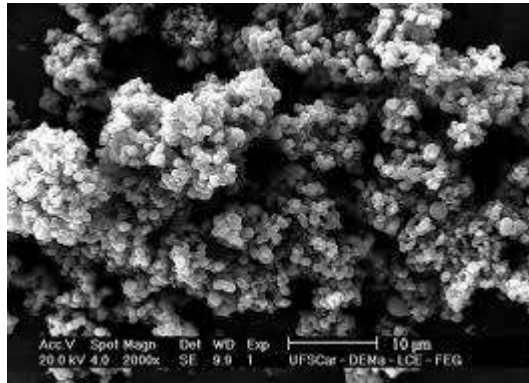
En la actualidad, se utiliza el titanio, Vitallium y acero inoxidable en piezas dentales ya que se consideran biológicamente inertes (Lewis et al., 2018, p. 310) (Figura 2.11). El bajo módulo de Young que posee el titanio beneficia a los implantes, y de esta manera las cargas esqueléticas se comparten uniformemente entre el hueso y el implante, lo que lleva a una menor incidencia de degradación ósea, esto se debe a que existe una protección contra el estrés y fracturas óseas periprostéticas. Sin embargo, el titanio al ser más rígido llevaría a deteriorar el hueso, esto debido a que los huesos adyacentes recibirían menor carga

(Fraunhofer-Gesellschaft, 2010; Takizawa, et al., 2018). Su gran resistencia a la corrosión, resistencia al ataque de fluidos corporales y ser compatible con la densidad del hueso promueven su uso en la ortodoncia (Froes & Qian, 2018).



**Figura 2.11.** “Implantes dentales de titanio y su inserción en la boca: (A) debajo de la encía, (B) pilar o núcleo y (C) corona en implante” (Froes & Qian, 2018).

El punto de fusión del titanio está sobre los  $1650^{\circ}\text{C}$  (1920 K), es un metal refractario (Andersson, Balfour, Bernath, Lindgren & Ram, 2003), es decir, un metal resistente al desgaste y calor de manera extraordinaria (Bauccio, 1993), presenta baja conductividad térmica y eléctrica (Andersson, Balfour, Bernath, Lindgren & Ram, 2003), su dureza y densidad son de las más altas de toda la tabla periódica (Laggasé, 1893), sin embargo al estar expuesto al aire se oxida, además reacciona con el oxígeno a temperaturas de 1470 K ( $1200^{\circ}\text{C}$ ) formando dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) (Bauccio, 1993) (Figura 2.12) generando problemas a largo plazo (Kim, Eo, Nguyen & Kim, 2019), esto se debe a que la capa de óxido producida solamente tiene entre 1 y 2 nm de espesor, pero después de cuatro años puede conseguir los 25 nm de grosor (Emsley, 2001). El titanio al ser un material no ferromagnético, es decir, que ante la presencia de un campo magnético forme imanes permanentes, las personas con este tipo de implantes dentales pueden realizar exámenes de resonancia magnética sin ningún problema, lo cual es recomendable para los que serán utilizados durante un largo periodo de tiempo (Chikazumi & Graham, 2009; Emsley, 2001).



**Figura 2.12.** Imagen de SEM de dióxido de titanio obtenida por sol-gel (Urbano et al., 2011).

Lo que lleva a que el titanio pueda considerarse como un biomaterial, por ser el que está en contacto con tejidos vivos, organismo o microorganismos, es decir, está diseñado en su totalidad para interactuar en sistemas biológicos, especialmente con fines médicos (Vert et al., 2012; Schmalz et al., 2008), sin embargo para que un biomaterial sea efectivo tiene que contar con biocompatibilidad, es decir, que su desempeño tenga respuesta positiva con el huésped con el cual interactúa (Black, 2005; Kammula & Morris, 2001) de modo que esté no debe generar ningún efecto adverso al sistema biológico en el que se encuentra (Vert, et al., 2012), pero actualmente es imposible generar biocompatibilidad total, esto se debe a que en algunos casos los implantes de titanio en el campo dental han generado problemas en forma de infecciones por la frecuentemente generación de  $\text{TiO}_2$  que con el paso del tiempo incrementa su cantidades, ya que la formación y aumento de éste es debido al contacto con fluidos corporales (Kim, Eo, Nguyen & Kim, 2019; Emsley, 2001; Sandoval-Amador et al., 2016).

Por lo tanto, precisando que el titanio es biocompatible y por ende apto para usos médicos, ya sean implantes quirúrgicos y dentales, donde los primeros pueden permanecer en el cuerpo durante un periodo de 20 años. De igual manera tiene capacidad inherente de osteointegrarse, haciendo referencia a que los implantes dentales pueden durar hasta 30 años, además de que esta característica es muy útil para implantes ortopédicos (Emsley, 2001, p. 452). Sin embargo, las propiedades físicas y químicas de titanio son determinantes para una integración satisfactoria del implante con el tejido óseo circundante (Isaacson & Jeyapalina, 2014; Jenko,

Gorenšek & Godec, 2016), esto se debe que a pesar de los diferentes procesos para modificar su superficie, el 30% de los casos desarrollan periimplantitis; la cual es una enfermedad que genera la pérdida del hueso de soporte e incluso la pérdida del implante (Schminke, 2015) (Figura 2.13 y Figura 2.14). Una cirugía inadecuada o mala interacción de hueso con el implante puede causar esta enfermedad (Robert & Charles, 1991; Mombelli & Lang, 1998), a pesar de ello se puede contrarrestar siempre y cuando exista un raspado para mejorar la cicatrización del hueso (Groessner-Schreiber & Tuan, 1992; Hulbert, Morrison & Klawitter, 1972). El trabajo de Buser (2001) confirma lo teorizado por Groessner-Schreiber et al. (1992) y de Hulbert et al. (1972) al aumentar 18 veces la resistencia al desgarro entre el hueso y el implante en un conejo al aumentar la rugosidad promedio de 10  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.13.** “Pérdida ósea periimplantaria” (Sánchez Garcés & Gay Escoda, 2004).



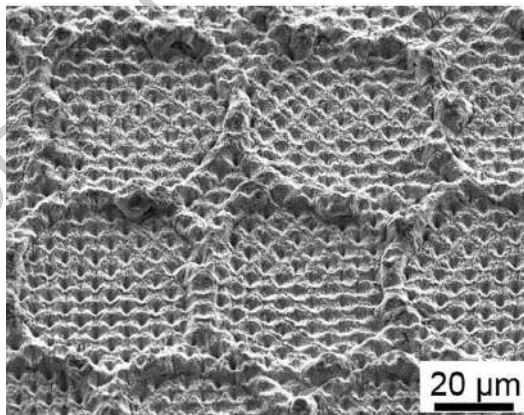
**Figura 2.14.** “Imagen radiográfica de una periimplantitis con pérdida ósea importante, especialmente en el implante, en posición más distal” (Sánchez Garcés & Gay Escoda, 2004).



A diferencia de la capa de óxido que se aumenta hasta los 25 nm de espesor como lo describe Emsley (2001) que es expuesto al medio ambiente, en los implantes dentales esta capa se comporta de manera diferente, aumentando de 5 nm a 200 nm en tan sólo 6 años (Yoon & Yordan, 1986).

### 2.3.1 Tratamiento del titanio

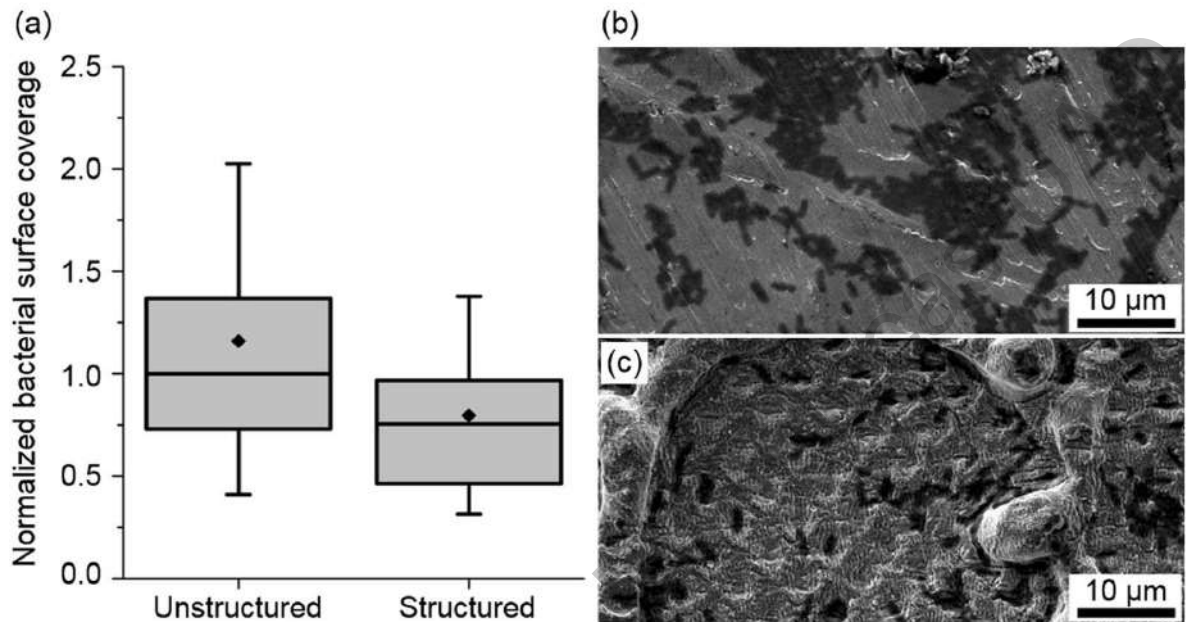
Zwahr, Helbig, Werner & Lasagni (2019) para evitar la adhesión bacteriana en el titanio y el crecimiento de  $\text{TiO}_2$  en los implantes generaron estructuras diferentes en titanio, dos de ellas a través de Escritura Láser Directa (DLW por sus siglas en inglés) y Patrones de Interferencia Láser Directa (DLIP por sus siglas en inglés), en donde usaron un láser infrarrojo de 1069 nm para crear patrones jerárquicos y evitar la adhesión bacteriana en implantes dentales. Las muestras que fueron atacadas cada 200 ns por DLW y en el caso del DLIP con 5 pulsos durante el mismo tiempo, generando una superficie rugosa promoviendo la adhesión de diversos materiales. Posteriormente en una sola muestra se realizaron los dos patrones de manera jerárquica (*Figura 2.15*), de esta manera la superficie deja de ser suave para evitar la fijación bacteriana en el titanio.



**Figura 2.15.** Patrón jerárquico DLW-DLIP en titanio (Zwahr, Helbig, Werner & Lasagni, 2019)

Con la superficie jerárquica creada por Zwahr, Helbig, Werner & Lasagni (2019) se reduce en un 30% la adhesión de bacterias, ya que al tener una superficie plana las bacterias se

reproducen y se fijan de mejor manera al material tal cual y se muestra en la *Figura 2.16A*, mientras que la superficie tratada se reduce considerablemente (*Figura 2.16*).

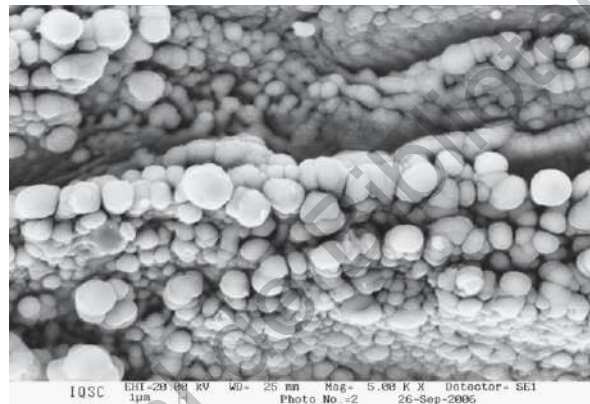


**Figura 2.16.** “Ensayo de adhesión bacteriana sobre superficies de titanio. (a) Muestra la cobertura de superficie bacteriana normalizada para las células de *E. Coli* después de 24 h. Los diagramas de caja-bigotes presentan la mitad de los puntos de datos dentro de la caja y el 100% dentro de los bigotes. Las líneas continuas negras y los diamantes negros dentro de los cuadros marcan la mediana y la media, respectivamente. Los valores se normalizan a la superficie mediana colonizada del área no estructurada de las muestras. (b) Muestra una imagen SEM de colonización bacteriana (áreas oscuras) en las superficies no estructuradas y (c) en la superficie estructurada con colonización bacteriana reducida” (Zwahr, Helbig, Werner & Lasagni, 2019).

Por otro lado, las modificaciones superficiales, como la del  $\text{TiO}_2$  e hidroxiapatita, en dispositivos óseos endóseos mejoran la osteointegración, por lo que el método irradiación láser que permite el control de sus variables involucradas al ser un proceso limpio y reproducible para la modificación de superficies: como la morfología, rugosidad superficial y formación de compuestos que facilitan la humectación, y que a su vez modifica las

propiedades físico-químicas del titanio, controla la formación de dióxido de titanio y aumenta la osteointegración (Braga, Marques, de A Filho & Guastaldi, 2007).

De la misma manera, el método de ablación láser realizado por Faeda et al. (2009) donde se trató titanio (Titanium Fix®, AS Technology, São José dos Campos, SP, Brazil) (Figura 2.17) para implantarse en 24 conejos neozelandeses de entre 9 y 12 meses de edad, tuvo una mejora significativa en el torque de extracción a diferencia de los implantes de superficies mecanizadas, lo que se comprueba que las propiedades físicas afectan el comportamiento de los implantes (Isaacson & Jeyapalina, 2014).

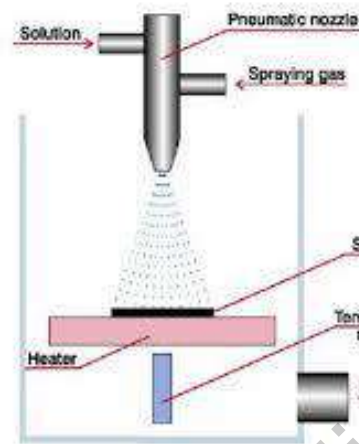


**Figura 2.17.** Imagen SEM del implante de titanio tratado por ablación en un conejo neozelandés, con un aumento de 5000 × (Isaacson & Jeyapalina, 2014).

#### **2.4 Deposición de hidroxiapatita en titanio**

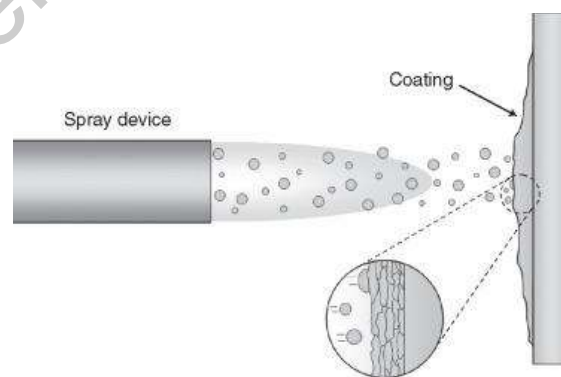
Todo lo anterior lleva a que se generen diferentes métodos de deposición de BIO-Hidroxiapatita en titanio. Uno de ellos es el rocío pirolítico (spray pyrolysis), el cual se utiliza principalmente para la generación de capas gruesas y delgadas, películas multicapas o revestimientos cerámicos y polvos. Su uso es muy común ya que es una técnica económica a comparación de otras por el uso de soluciones no requerido de alta pureza (Filipovic et al., 2013). Este equipo consiste básicamente en un atomizador, la solución del precursor, control de temperatura y calentador del sustrato, mientras que los usados como salida de aire son los atomizadores por medio ultrasónico y electrostático. Sin embargo existen cambios de temperatura en todo el proceso, la temperatura de la superficie del sustrato lo convierten en

un parámetro principal que determina las propiedades y morfología de la película (Perednis & Gauckler, 2005) (Figura 2.18).



**Figura 2.18.** Esquema del método de rocío pirolítico (Sánchez, 2010).

La pulverización en frío (cold spray) es otro método de recubrimiento que consiste en un compresor de gas, un calentador de gas, un controlador, un alimentador de polvo, un calentador de polvo y una boquilla del tipo Laval estándar, donde el controlador transfiere gas de un tanque de gas a un controlador del mismo y a un alimentador de polvo. El calentador aumenta la energía cinética del gas comprimido y de esta manera crece la velocidad de disparo (Lee et al., 2013, p. 6178) (Figura 2.19).

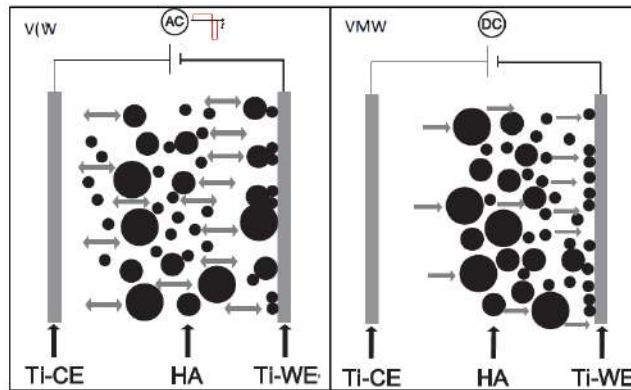


**Figura 2.19.** Esquema del método de pulverización en frío (Smith, 2007).

Lee et al. (2013) hicieron un híbrido entre hidroxiapatita y polieterecetona (PEEK) a través pulverización en frío para evaluar su osteointegración in vitro e in vivo, concluyen que el

recubrimiento de hidroxiapatita (HAp) puede mejorar la biofuncionalidad de varios dispositivos médicos utilizados en diferentes aplicaciones clínicas ya que aumento la biocompatibilidad y se promovió la osteointegración, además de todo, el anclaje de la hidroxiapatita mejoro con este método de deposición. A pesar de ello, la principal desventaja de este método es que puede existir una deformación plástica, lo que conduce a una pérdida de ductilidad del recubrimiento (Karthikeyan, 2007). A su vez Lee et al. (2013) utilizan la carta de identificación de Difracción de Rayos X JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) No. 84-1998, pero la empleada para los implantes quirúrgicos es la ICDD (International Center for Diffraction Data) No. 00-009-0432 tal cual lo menciona la norma ISO 13779-6:2015 en el apartado 6 referido a polvos, en las secciones de implantes quirúrgicos e hidroxiapatita (ISO, 2015). Por consiguiente podría causar problemas para alguna futura aplicación, ya que esta norma da las especificaciones para obtener dispositivos médicos de alta calidad y el nivel aceptable de respuesta biológica si el material se usa en aplicaciones apropiadas (ISO, 2015).

También existe la deposición electroforética (*Figura 2.20*) que se realiza mediante corriente alterna (A.C., por sus siglas en inglés) o corriente directa (D.C., por sus siglas en inglés) en donde la muestra se deja en una solución de butanol, ya que le da mucha estabilidad a la hidroxiapatita, a comparación del etanol que reduce la velocidad de evaporación y agrietamiento durante el secado de los depósitos de hidroxiapatita. Posteriormente se le aplica cierto voltaje D.C. y otro A.C. teniendo como resultados que los recubrimientos con corriente alterna son más densos y menos agrietados a comparación de los de corriente directa, a pesar de esto, los dos tienen un grosor de tamaño similar (Kollath et. al., 2013). No obstante, la deposición con A.C. tiene varias ventajas al poder manejar las frecuencias de onda y la migración de partículas con respecto con su asimetría, por lo que se pueden depositar partículas con amplia distribución de tamaño (Kollath, et. al., 2013). Sin embargo, el agrietamiento de la hidroxiapatita en el titanio conllevaría un riesgo para futuras aplicaciones odontológicas al no ser un depósito homogéneo.



**Figura 2.20.** Movimiento de las partículas durante la deposición electroforética en A.C. y D.C., en donde WE es el electrodo de trabajo y CE el contraelectrodo (Kollath et. al., 2013).

La biocerámica nanoestructurada cada vez es más utilizada en nuestro tiempo por su increíble biocompatibilidad especialmente en la odontología (Camargo, et al., 2009), ya que se requieren soluciones a diferentes problemas desatados por defectos óseos con diferentes extensiones y características, especialmente la reconstrucción de lesiones óseas periodontales y traumáticas. Por lo que la hidroxiapatita es de suma importancia, ya que es conveniente usarla como implantación semiabsorbible en tejido vivo (aloplástico semiabsorbible), puesto que influye en el crecimiento óseo y su resorción por su estructura; sin embargo, para permitir el crecimiento óseo la hidroxiapatita debe superar los 100  $\mu\text{m}$  (Carotenuto, Spagnuolo, Ambrosio & Nicolais, 1999). De la misma forma, este cerámico es de suma importancia para las cirugías maxilofaciales por ser el cristal que predomina en los dientes y el cual le proporciona su dureza característica (García-Garduño & Reyes-Gasga, 2006), de manera que es importante saber la procedencia de este material.

## 2.5 Técnicas de caracterización

### 2.5.1 Difracción de Rayos X (DRX)

El físico alemán W. C. Röntgen en 1895 descubrió los rayos X y fue el primero en tomar una radiografía (Figura 2.21), con lo que se galardonó con el premio Nobel en física en el año de 1901, sin embargo no fue hasta 1912 cuando Laue, Friedrich y Knipping hallaron el fenómeno de difracción de rayos X en un cristal de sulfato de cobre, con lo que se demostró la naturaleza ondulatoria de estos de manera conveniente para formar parte de la región más

corta de longitudes de onda en el espectro electromagnético, que a su vez este fenómeno es la definitiva y primera prueba experimental periodicidad de los cristales (Hammond, 2001).



**Figura 2.21.** Una de las primeras radiografías tomadas por Röntgen (Glasser, 1993).

Actualmente se sabe que la región de los rayos X es aproximadamente igual a  $10^{-8}$  cm, mientras que en la difracción de rayos X esta aproximadamente en el orden de 0.5 y 0.25 Å, por lo que la región en donde se encuentran es entre los rayos gamma y ultravioleta (Cullity, 1956).

Los rayos X son producidos siempre que una partícula cargada con suficiente energía cinética es desacelerada rápidamente, usualmente para la difracción de rayos X se utilizan electrones ( $e^-$ ) producidos en un tubo de rayos X, el cual contiene dos electrodos metálicos y una fuente de electrones. Al mantenerse un alto voltaje entre los electrodos, los  $e^-$  llegan rápidamente al ánodo (objetivo), lo que hace que impacten a muy alta velocidad. Este impacto genera rayos X, radiando en todas direcciones. Sin embargo, al tener un tubo de voltaje de 30 kV la mayoría de la energía cinética del choque se convierte en calor, mientras que menos del 1% se transforma en rayos X (Cullity, 1956).

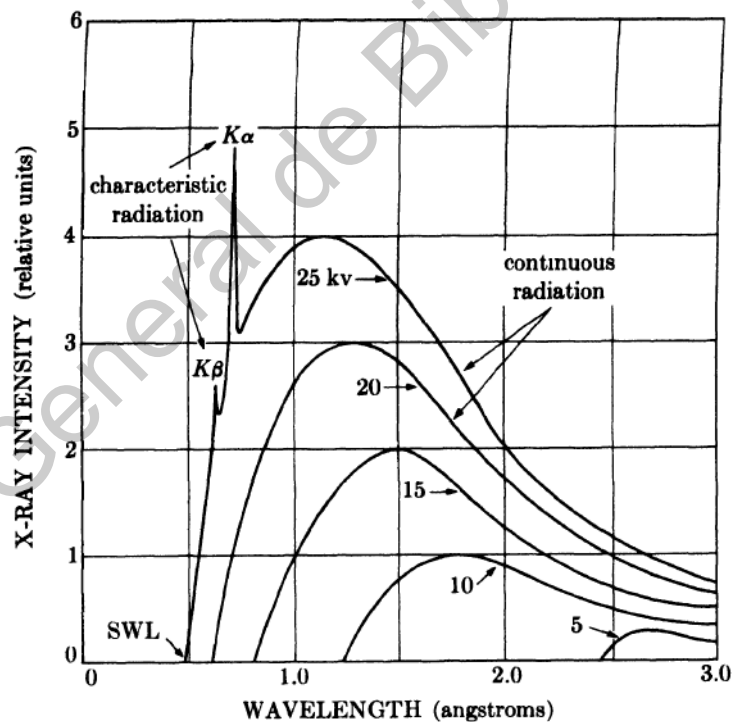
Los rayos emitidos por el objetivo vienen en diferentes longitudes de onda, en una forma de mezcla, y la variación de estas con la intensidad depende del tubo de voltaje. La curva que se obtiene por este efecto se puede observar en la *Figura 2.22*, donde la intensidad que es cero hasta cierta longitud de onda, se le conoce como *límite de longitud de onda corta* ( $\lambda_{SWL}$ , *short-wavelength limit*), la cual crece rápidamente hasta el máximo y posteriormente decrece.

Siempre que el tubo de voltaje aumente su voltaje, la intensidad de  $\lambda_{SWL}$  crece y la posición máxima se convierte en longitudes de onda cortas. Ya que al aumentar el voltaje la cantidad de fotones por segundo a la longitud de onda necesaria emitidos por el impacto con el objetivo crece, lo que nos lleva a una mayor energía promedio por fotón, es decir, al ser mayor esta energía se observa una mayor intensidad de rayos X. Para determinar la longitud de onda necesaria ( $\lambda_{SWL}$ ) para los diferentes voltajes se utiliza la ecuación 2:

$$\lambda_{SWL} = \frac{12400}{V} \quad (2)$$

En donde  $V$  es el voltaje emitido por el tubo de voltaje (Cullity, 1956).

Mientras la radiación continua que se observa en la *Figura 2.22* se debe a la desaceleración de los electrones (Cullity, 1956).



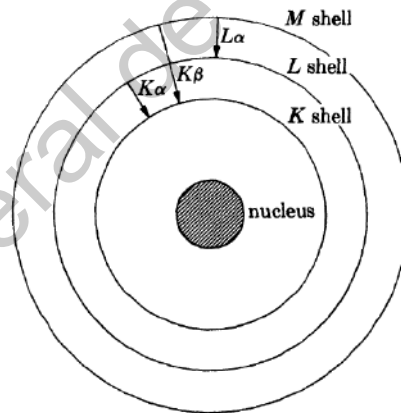
**Figura 2.22.** “Espectro de radiación de molibdeno en función del voltaje aplicado” (Cullity, 1956).

Siempre que el voltaje del tubo de rayos X se eleve sobre el valor crítico tendremos longitudes de onda superpuesta en el espectro continuo, estas son características del ánodo y se le conoce



como *líneas características* que a su vez decaen en conjuntos denominados *K, L, M, etc.*, a medida que estas líneas aumenten el *espectro característico* del objetivo aumenta, a pesar de esto, solamente las líneas *K* son detectadas en la difracción de rayos X al ser del orden de 0.7 Å, mientras que las demás son absorbidas con facilidad; sin embargo, en los trabajos de difracción solamente podemos observar con precisión  $K\alpha_1$  (0.70926 Å),  $K\alpha_2$  (0.71354 Å) y  $K\beta_1$  (0.63225 Å). Por lo que al resolver se deben separar las líneas del espectro inicial, para esto se aprovecha la cercanía de  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  y se utiliza el método *K $\alpha$  doble* (Cullity, 1956).

Las *líneas del espectro característico* se originan en los átomos del material del objetivo, es decir, considerando al átomo como un núcleo que a su alrededor orbitan electrones en varias capas (*Figura 2.23*) al ser bombardeado por electrones con suficiente energía pueden sacar un  $e^-$  de la capa *K* dejando al átomo excitado, en un estado de alta energía. Esto lleva que otro electrón ocupe su lugar hasta llegar al estado de energía normal, el llenado de continuo de estas vacancias genera las *líneas características* (Cullity, 1956).



**Figura 2.23.** “Transición electrónica en el átomo. Proceso de emisión indicado por flechas” (Cullity, 1956).

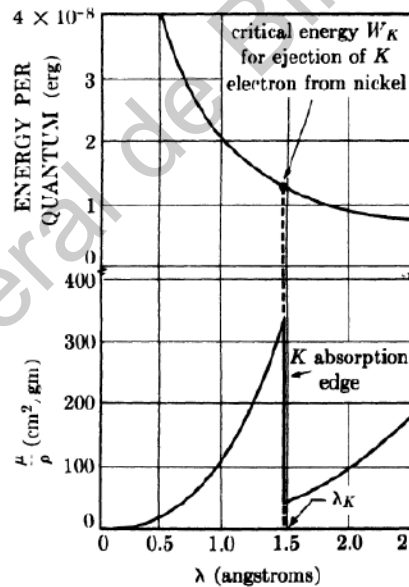
No solo los electrones interactúan con los átomos sino que los rayos X también lo hacen, de manera que estos al encontrarse con materia se transmiten y absorben parcialmente, lo que nos lleva al decrecimiento de la intensidad siguiendo la forma diferencial de:

$$-\frac{dI}{I} = \mu dx \quad (3)$$

Siendo  $\mu$  el coeficiente de absorción lineal (intrínseco de cada material), al integrarlo y tomando la densidad se determina  $I_x$  (intensidad transmitida del haz) en términos de la intensidad incidente de los rayos X ( $I_0$ ), el coeficiente de absorción de masa ( $\mu/\rho$ ) y la densidad, dado como resultado a ecuación 4:

$$I_x = I_0 e^{-\left(\frac{\mu}{\rho}\right)\rho x} \quad (4)$$

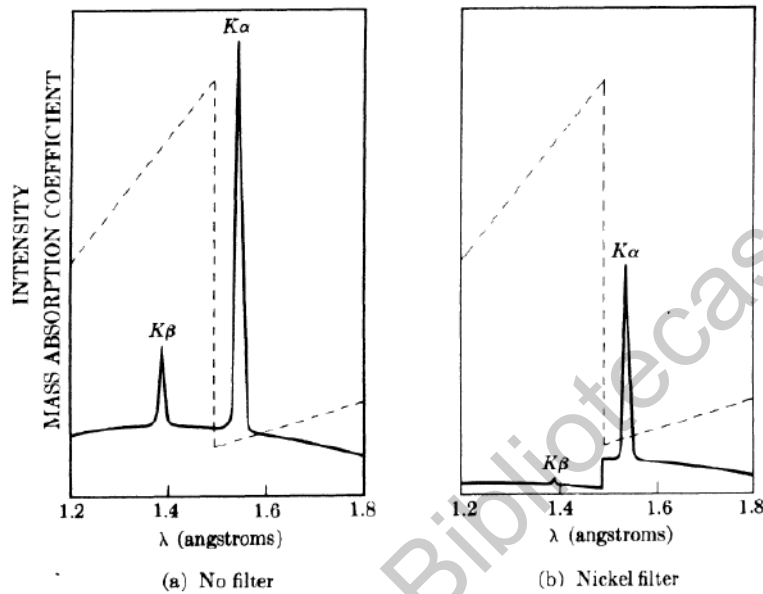
La importancia del coeficiente de absorción de masa es la facilidad de absorción de cada material, esto se debe se genera una brecha entre la energía crítica para la eyección de un electrón en la línea K y la variación del material al absorber para formar una zona de absorción (Figura 2.24), en donde  $\lambda_{SWL}$  tiene una alta penetración, llamada *dura*, mientras que la longitud de onda larga de los rayos X es fácilmente absorbida, es decir, *blanda* (Cullity, 1956).



**Figura 2.24.** “Variación con la longitud de onda de la energía por cuanto de rayos X y del coeficiente de absorción de masa del níquel” (Cullity, 1956).

La radiación monocromática en los experimentos de difracción de rayos X es necesaria, por lo que es necesario filtrar la radiación que se obtiene de  $K\alpha_1$ ,  $K\alpha_2$  y  $K\beta_1$ , para esto se utiliza un filtro que absorbe la radiación K, para que este material funcione es necesario que tenga

números atómicos 1 o 2. La diferencia entre usar el filtro se observa en la *Figura 2.25* (Cullity, 1956).



**Figura 2.25.** Diferencia entre un espectro sin filtro y otro con filtro (Cullity, 1956).

El filtro de suma importancia, por lo tanto Cullity (1956) nos menciona que el “material del filtro usualmente es usado en forma de láminas. Si no es posible obtener un material estable en forma de láminas, el óxido del metal también puede ser utilizado.” (p.p. 17).

Para la producción de rayos X se necesitan tubos de rayos X (dicho con anterioridad), estos son tubos de filamento inventados en 1913 por Coolidge consisten en un espejo sobre el cual se aísla en ánodo y cátodo, el ánodo inicia con un bloque de enfriamiento de agua de cobre que contiene el objetivo metálico insertado en el extremo, por otro lado el cátodo es un filamento de tungsteno (*Figura 2.26*) (Cullity, 1956).

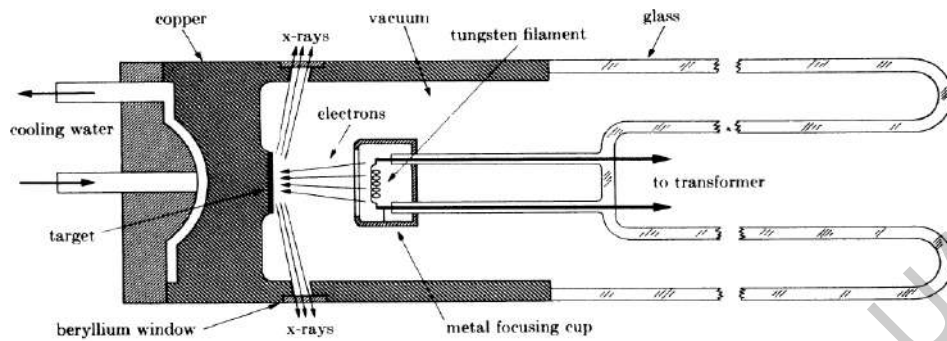
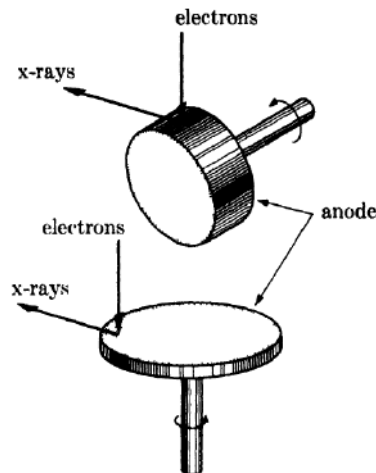


FIG. 1-13. Cross section of sealed-off filament x-ray tube (schematic).

**Figura 2.26.** Vista interior de un tubo de rayos X (Cullity, 1956).

Primeramente el filamento es calentado por corriente eléctrica, esto lo lleva a la emisión de electrones que recorren rápidamente el tubo hasta llegar al objetivo (Cullity, 1956).

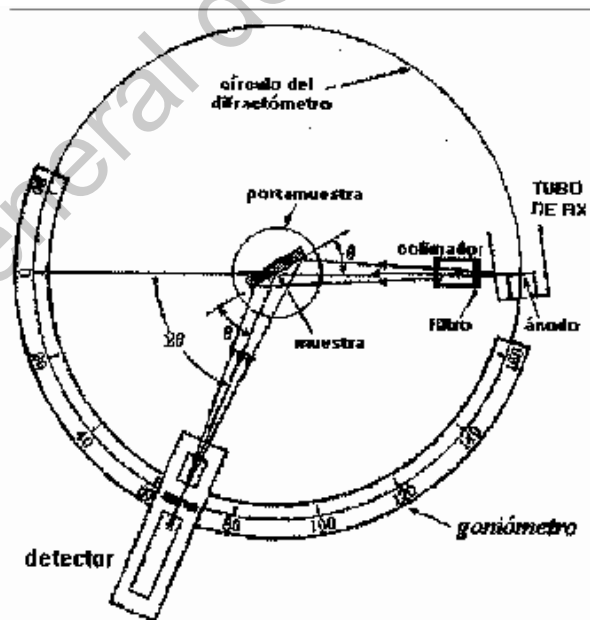
El filamento está rodeado por una pequeña copa metálica que repele los electrones y a su vez tiende a enfocarlos en una región cercana (punto focal). El punto focal emite rayos X en todas direcciones; sin embargo al ser poco eficiente la emisión de rayos X hace que la intensidad de los haces sea más baja, lo que ha llevado a diferentes soluciones, una de ellas es el *tubo de ánodo giratorio* (Figura 2.27), el cual es un ánodo con rotación que trae consigo el objetivo, que lleva a una mayor entrada de energía sin necesidad de que el ánodo se caliente excesivamente (Cullity, 1956).



**Figura 2.27.** Ejemplos de ánodos giratorios (Cullity, 1956).

Para la detección de los rayos X normalmente se utilizan pantallas fluorescentes, las cuales son una capa delgada de sulfuro de zinc con rastros de níquel, montadas en un soporte de cartón, esto ayuda a los rayos X, ya que al estar en contacto con el haz el compuesto emite fluorescencia. Las películas fotográficas son otro tipo de detectores hechos de una capa gruesa de emulsión de ambos lados para mejorar la absorción total, sin embargo el tamaño de grano se vuelve grande, lo que impide que se vea detalles finos y a su vez no soporta mucha ampliación. Por último, los dispositivos de ionización producen un gas con el que miden la intensidad de los rayos X por la cantidad de ionización de este, lo que lleva a la eliminación de un electrón de una molécula de gas y dejar un ion positivo (Cullity, 1956).

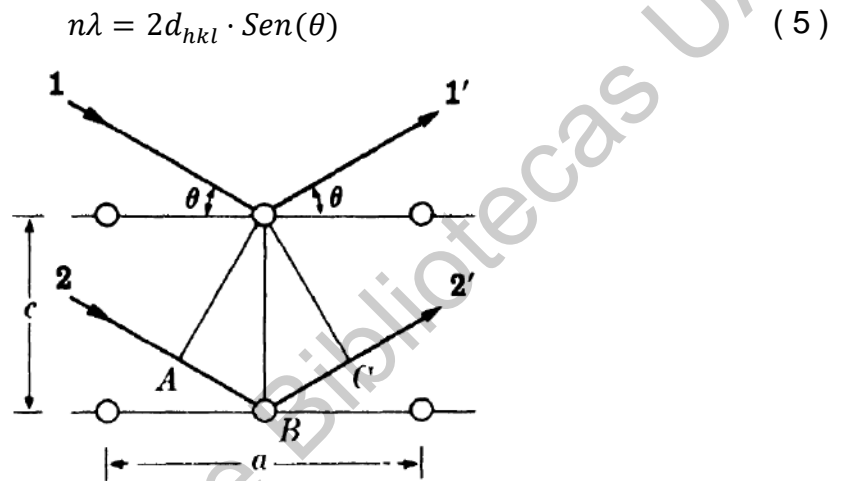
Juntando los dispositivos en uno sólo (Figura 2.28) se genera un difractómetro de rayos X (Cullity, 1956) que sirve para analizar materiales con características cristalinas a través de la difracción de rayos X en un sólido, esto nos permite identificar las fases cristalinas, defectos estructurales, grado de desorden cristalino, orientación preferencial, tamaño de grano, tensiones, entre otras propiedades (Dean, 1995).



**Figura 2.28.** Esquema de un difractómetro de rayos X (Camposano & Martínez, 2000).

Para que el equipo pueda analizar una muestra, esta necesita estar en polvo en cantidades de entre 1 mg y 10 mg (Guglielmi, Kickelbick & Martucci, 2014).

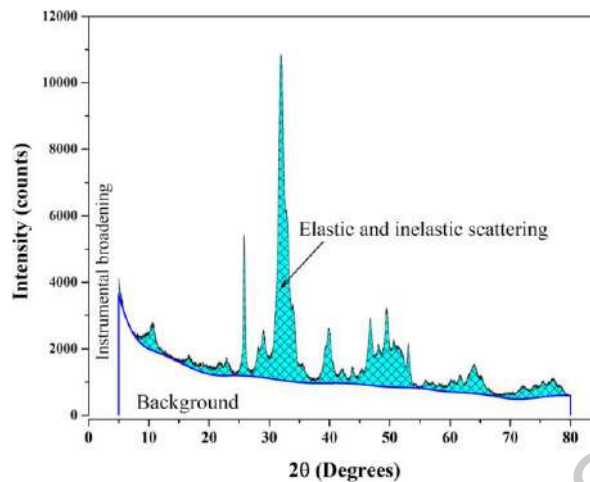
El funcionamiento del difractómetro de rayos X se basa en la ley de Bragg (representación gráfica en la *Figura 2.29*), que establece una relación entre el ángulo de difracción ( $\theta$ ), la longitud de onda de los rayos X ( $\lambda$ ) y la distancia entre cada plano atómica de la red cristalina ( $d_{hkl}$ ), donde se cumple un orden de reflexión ( $n$ ) de un número entero mayor o igual a 1 (ecuación 5) (Cullity, 1956).



**Figura 2.29.** Representación gráfica de la Ley de Bragg (Cullity, 1956).

Con la ecuación 5 podemos determinar las distancias interplanares al despejar  $d_{hkl}$  de la ecuación 5. Estos solamente dependen de la geometría de la celda unitaria, las intensidades de los rayos X, del tipo de átomos del cristal y la ubicación de estos en la celda unitaria (Dean, 1995).

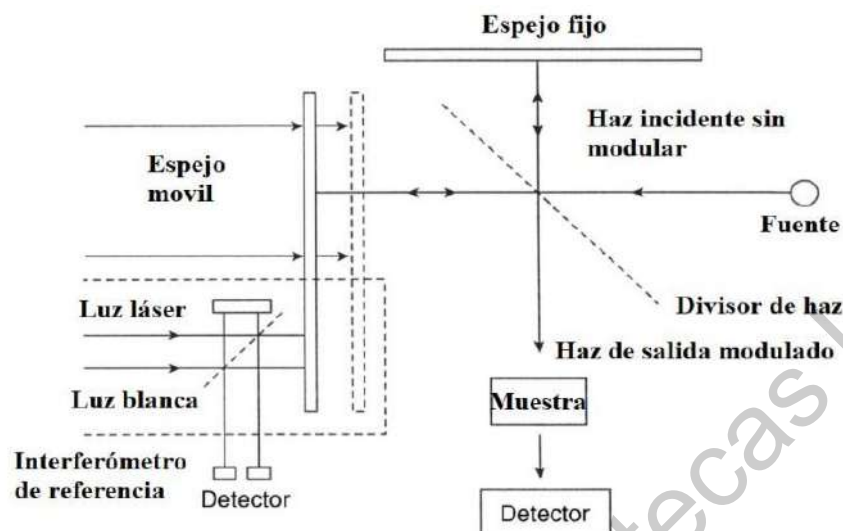
Los resultados obtenidos por esta técnica se representan en un difractograma de rayos X, como se observa en la *Figura 2.30*, en los que se aprecian picos de diferentes intensidades en función de un ángulo  $2\theta$  de difracción, el patrón es característico de cada material (Cullity, 1956).



**Figura 2.30.** “Patrón de difracción de rayos X típico de hueso bovino desgrasado y desproteínizado” (Londoño-Restrepo et al., 2019).

### 2.5.2 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

La técnica de caracterización FT-IR es un método utilizado para investigar la composición de la muestra por su versatilidad, ya que está basada en la respuesta de las vibraciones moleculares y atómicas con la presencia de radiación infrarroja (Guglielmi, Kickelbick & Martucci, 2014). Este funciona por el principio de Michelson (*Figura 2.31*), el cual nos dice que si la radiación golpea primero a un divisor o separador, divide el haz de luz en dos partes iguales (espejo semireflejante). Posteriormente estos haces interfieren con otro divisor después de haber sido reflejado por otros dos espejos en su viaje, uno que acomoda la trayectoria del haz original (espejos móviles) y otro perpendicular (espejo fijo). La muestra a analizar es colocada en esta trayectoria, en donde más adelante se encuentra un detector infrarrojo que mide la superposición de los dos haces en función del desfase o desfases del espejo móvil en su desplazamiento con respecto a la posición intermedia (Smith, 1998).



**Figura 2.31.** Esquema del interferómetro de Michelson (Jeronimo-Cruz, 2018).

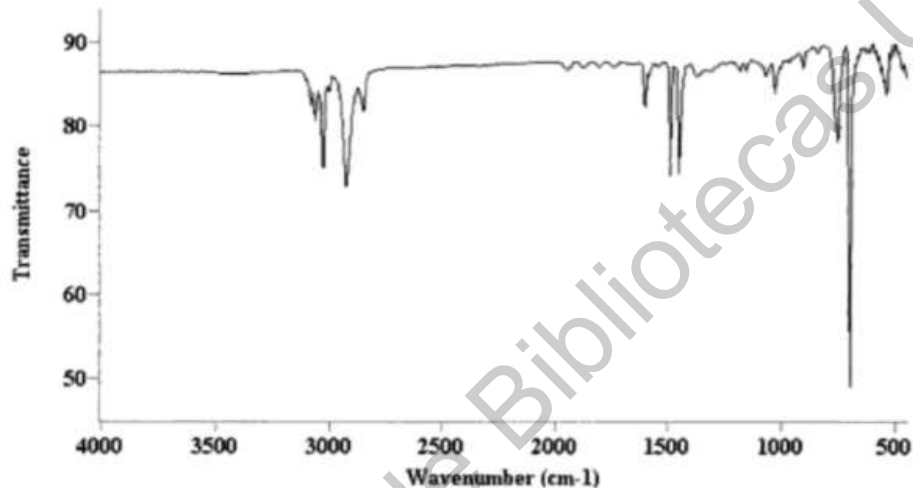
Para un mejor entendimiento de la técnica se tiene que conocer que el espectro infrarrojo está dividido en tres regiones: de  $14000\text{ cm}^{-1}$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$  se encuentra el infrarrojo cercano, infrarrojo medio (aproximadamente  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ ) y el infrarrojo lejano. En donde la región media es la utilizada para el estudio de las vibraciones fundamentales y su estructura rotacional en la espectroscopia infrarroja (Guglielmi, Kickelbick & Martucci, 2014).

Las mediciones se realizan por absorción o reflexión, ya sea por reflectancia difusa (DRS) o reflectancia total atenuada (ATR), estos dos métodos utilizan la absorción de radiación infrarroja que corresponden a las frecuencias de resonancia de cada modo vibracional de los cristales o moléculas del material, esto es que en cada ocasión que el haz de luz atraviese o se refleje en la muestra (sólida o líquida) absorbiendo energía correspondiente a su frecuencia resonante, las frecuencias no absorbidas se transmitirán a un detector, permitiendo la identificación de las frecuencias absorbidas (Guglielmi, Kickelbick & Martucci, 2014).

Para que la molécula muestre absorción infrarroja debe tener cambios en sus dipolos moleculares asociados a vibraciones y rotaciones de los grupos funcionales al momento de interactuar con la radiación infrarroja. Las vibraciones se denotan como el cambio de longitud de la unión (estiramiento) o el ángulo de la unión (flexión), esto lleva a que las moléculas puedan estirarse en desfase o fase (Ferrari, Giannini, Sideri & Zanette, 1985).



Un ejemplo del espectro detectado por FT-IR se muestra en la *Figura 2.32*, en donde el eje vertical grafica la transmitancia (%), mientras que el eje horizontal las longitudes de onda infrarrojas expresadas en número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). Cabe destacar que si la transmitancia es del 100% significa nula absorción por parte del material, además que cada patrón es característico de la molécula en su composición total.



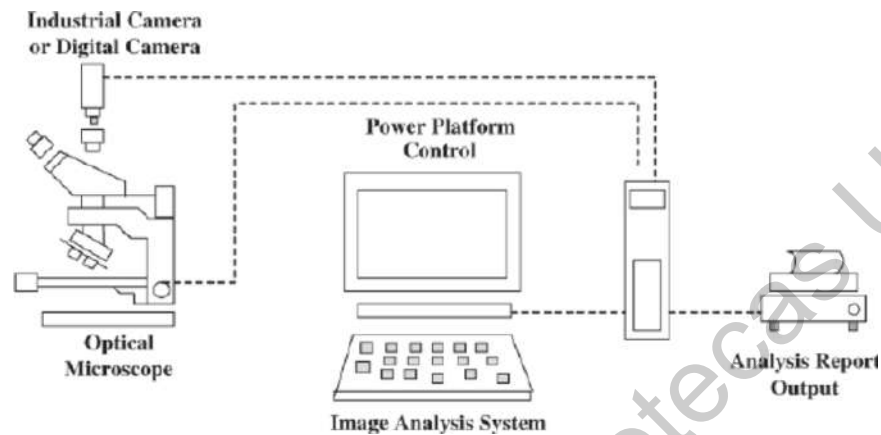
**Figura 2.32.** Espectro infrarrojo del poliestireno (Smith, 1998).

### 2.5.3 Microscopía digital

El microscopio digital está equipado de una cámara digital que permite la captura de imágenes de diferentes muestras, la importancia de la técnica es la visualización en tiempo real con una pantalla incorporada en el equipo o transmitidas a una computadora (Wu, Merchant & Castleman, 2010).

Generalmente este tipo de microscopios se componen de un módulo óptico de microscopía, un módulo de adquisición de datos (el encargado del procesamiento de las imágenes) y un módulo de control de software (*Figura 2.33*). El módulo óptico es el encargado de la microscopía de las imágenes, el módulo de adquisición de datos registra las imágenes producidas por el dispositivo de captura (por lo regular una cámara digital), posteriormente se transfieren a un ordenador a través de una interfaz de tarjeta gráfica o una interfaz USB, mientras que el módulo de control de software controla todo el sistema, es decir, tiene control sobre la captura de la imagen, el procesamiento y la medición de imágenes en tiempo real

(usualmente se utiliza un televisor a color o un monitor) para el mejoramiento de la calidad de ellas (Chen, Zheng & Liu, 2011).



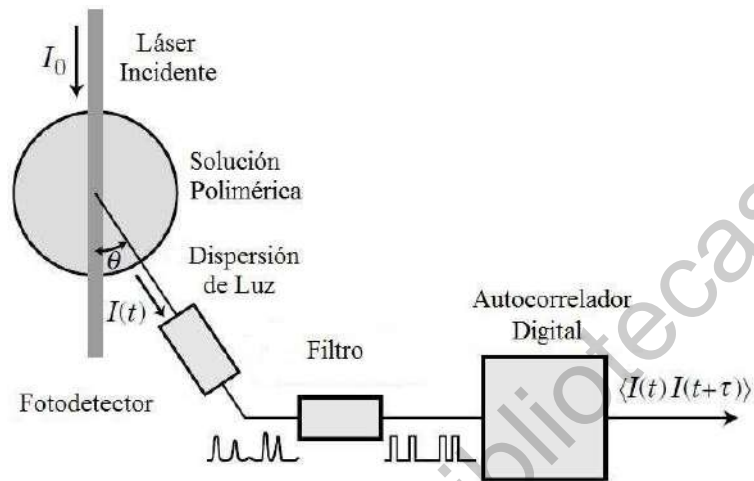
**Figura 2.33.** Esquema de los tres módulos que componen a un microscopio digital (Chen, Zheng & Liu, 2011).

La tecnología utilizada en este tipo de microscopios genera un buen posprocesamiento de imágenes, ya que los paquetes de software son específicos, dando una amplia funcionalidad o esquemas útiles, lo que lleva a la detección de geometrías simples y análisis sofisticado para la identificación de geometrías complejas, además de segmentación avanzada de imágenes, detección de contornos y formas de objetos pequeños, categorizar secciones, entre otras habilidades dependientes de cada software. Varios esquemas pueden utilizar herramientas para generar diagramas de espectros, perfiles espectrales, el pseudo-color, la forma de la superficie tridimensional, etc., esto se logra al manipular los datos para poderlos mostrar en diferentes formatos (Chen, Zheng & Liu, 2011).

#### 2.5.4 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

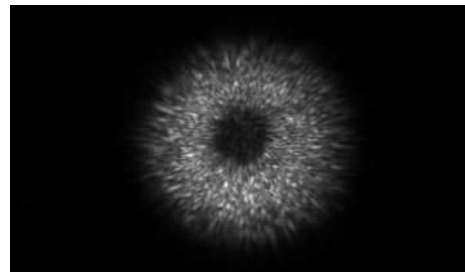
La Dispersión de Luz Dinámica (ver esquema en la *Figura 2.34*) se utiliza para determinar la distribución del tamaño de pequeñas partículas en una suspensión (Berne & Pecora, 2000). Sin embargo la técnica de DLS genera fluctuaciones temporales, estas se suelen analizar por un método de autorrelación de fotones o intensidad, en donde la función de autocorrelación (ACF, por sus siglas en inglés) generalmente decae desde el tiempo retardado cero, pero al tener una dinámica más rápida por las partículas pequeñas, conduce a una veloz

des correlación de la tasa de intensidad dispersa. La ACF es la transformación de Fourier del espectro de potencia, esto quiere decir que las mediciones de la Dispersión de Luz Dinámica se pueden realizar también en el dominio espectral (Chu, 1970; Pecora, 1964).



**Figura 2.34.** Esquema del funcionamiento de DLS (Ruiz Bonilla, 2018).

El funcionamiento inicia con el disparo de un haz de luz monocromático que pasa por un polarizador y posteriormente por dentro de la muestra en donde la luz se dispersa pasando por un segundo polarizador, en donde un fotomultiplicador recolecta la información y la proyecta en una imagen resultante que se conoce como patrón moteado (Goodman, 1976) (Figura 2.35).

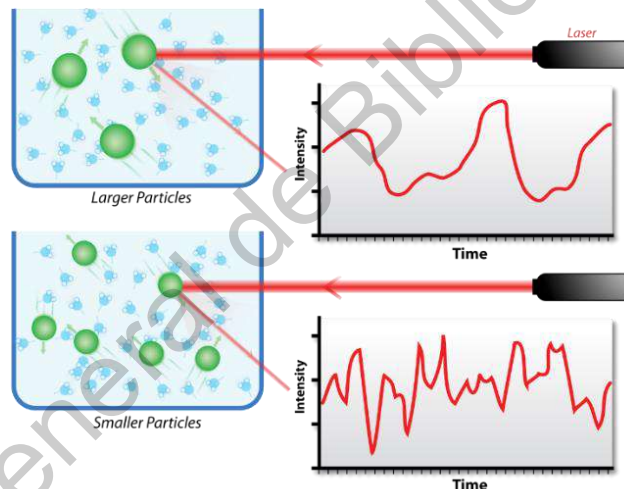


**Figura 2.35.** Ejemplo de patrón moteado (Wissmann et al., 2006).

Cuando las moléculas de la solución son golpeadas por el haz, difractan luz en todas direcciones. La luz difractada interfiere constructivamente, generando una región clara, o destructivamente, formando una región oscura. El proceso es repetitivo en intervalos de

tiempo cortos, mientras que los patrones moteados resultantes son analizados por un autocorrelacionador comparando la intensidad de la luz a lo largo del tiempo en cada punto. Los polarizadores se pueden configurar para dos geometrías diferentes, una de ellas es la geometría vertical (VV), en donde el polarizador permite que el haz de luz pase en la misma dirección que el polarizador principal, mientras que en una geometría horizontal (VH), el segundo polarizador no permite que la luz viaje en la misma dirección que el haz incidente (Goodman, 1976).

Los patrones de Dispersión de Luz pueden variar mucho dependiendo de la cantidad de sustancia en la solución y del tamaño de las moléculas que se analizarán (Goodman, 1976) (Figura 2.36).



**Figura 2.36.** DLS de partículas grandes (parte superior) y partículas pequeñas (parte inferior) (Guerrero et al., 2018).

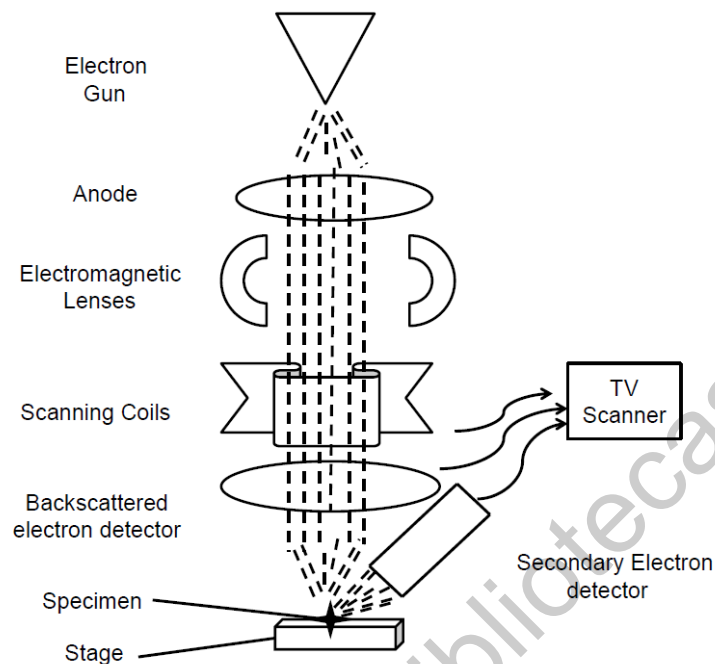
### 2.5.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Actualmente se necesitan técnicas con mayor resolución que los microscopios ópticos, esto se debe a que este último está limitado por la longitud de onda de la luz (entre 400 nm y 700 nm), por lo que para observar objetos más pequeños, especialmente a escala nanométrica, se necesitan longitudes de onda mucho más pequeñas, esto nos lleva a utilizar electrones (con  $\lambda$  entre 0.003 nm y 0.01 nm) (Hawkes & Spence, 2008).

El microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) y el microscopio electrónico de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) surgieron como respuesta a la problemática anterior (Hawkes & Spence, 2008). En donde el primero se utilizan generalmente para la obtención de imágenes superficiales de la morfología del material, mientras que TEM proporciona información detallada de las microestructuras que no pueden ser vistas de manera superficial (Guglielmi, Kickelbick & Martucci, 2014; Hawkes & Spence, 2008).

SEM funciona a través de un principio básico en el que al hacer incidir un haz de electrones enfocados en la superficie de un sólido, estos interactúan con el material tal que se producen señales de electrones retrodispersados, los secundarios y Auger, a su vez también emanan fotones de fluorescencia de rayos X y fotones de varias energías que se recolectan en diferentes detectores para que posteriormente sean procesados por una computadora y formar una imagen (Skoog, Holler & Crouch, 2017).

Dos partes principales componen al microscopio electrónico de barrido, las cuales son la columna del microscopio y el sistema electrónico (*Figura 2.37*), la primera conforma de un cátodo, un cilindro Wehnel y un ánodo (cañón de electrones), uno o dos lentes condensadores, bobinas de escaneo para deflexión X, Y (dos pares de bobinas de deflexión de haz), el objetivo y varias aperturas (Skoog, Holler & Crouch, 2017).



**Figura 2.37.** Esquema del funcionamiento de SEM (Tare, Puli, Oros & Singh, 2009).

En el extremo inferior de la columna del microscopio se encuentra la cámara de la muestra y los diferentes detectores para las señales que se emitan de la interacción de los electrones con la muestra (en la base). La columna del microscopio y la cámara de la muestra se encuentran en ultra alto vacío para que los electrones viajen al cátodo con la menor interacción con el medio (Hawkes & Spence, 2008).

El control y suministro de energía para la tensión de aceleración (entre 0.3 kV y 3 kV) del microscopio son parte de su sistema electrónico al igual que el condensador, las lentes objetivas, el generador de escaneo y los amplificadores electrónicos para las diferentes señales que se adquirirán durante la técnica. Los microscopios electrónicos de barrido modernos utilizan como control un software de ejecución especializado capaz de controlar sus parámetros, permitiendo la obtención y almacenaje de imágenes digitales (Hawkes & Spence, 2008).

### 2.5.6 Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersiva (EDS)

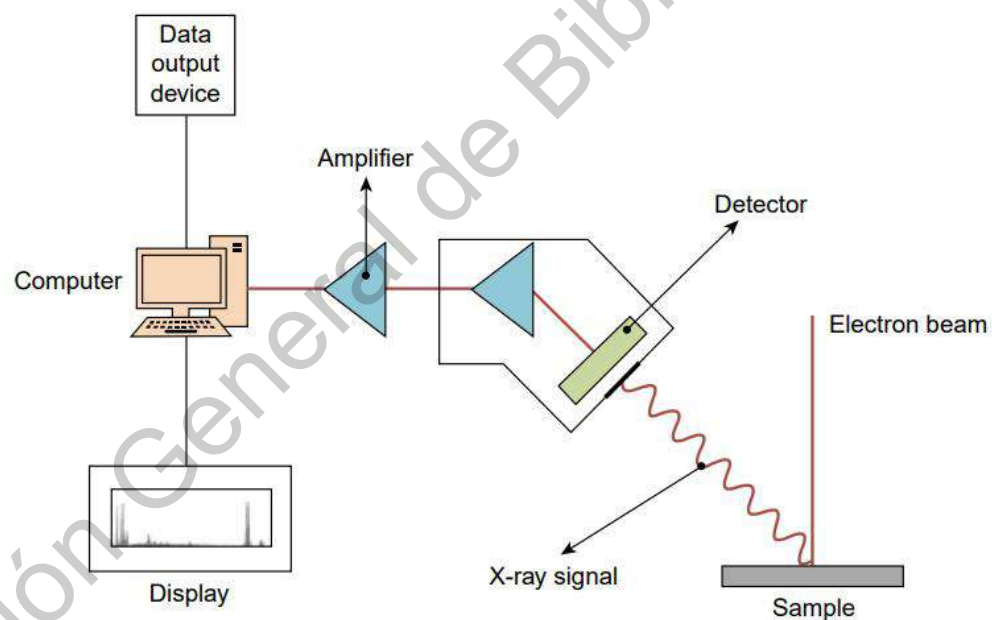
La Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersiva (EDS por sus siglas en inglés) es un método de caracterización química o analítica de los materiales. Los sistemas de EDS están

generalmente conectados a un instrumento de microscopía electrónica, ya sea de barrido (SEM) o de transmisión (TEM) (Colpan et al., 2018).

Esta técnica de caracterización se basa en la emisión de rayos X característicos de la muestra, es decir, un haz de partículas cargadas (protones o electrones) se enfoca en la muestra a estudiar. Esto significa que un electrón de un nivel de enlace más alto cae en el agujero del núcleo y emite un rayo X con la energía de la diferencia de las energías de enlace del nivel de electrones (Colpan et al., 2018).

La importancia de EDS es proporcionar un espectro picos y de color de la composición elemental de la muestra a estudiar (Colpan et al., 2018).

En la *Figura 2.38* se puede observar un esquema sobre esta técnica.



**Figura 2.38.** Esquema de un equipo de EDS conectado a un instrumento de microscopía electrónica (Colpan et al., 2018)

### 3 HIPÓTESIS

Mediante un proceso de deposición en frío es posible el anclaje de semillas de BIO-Hidroxiapatita sobre titanio poroso para la producción películas delgadas nanocristalinas.

Dirección General de Bibliotecas UAQ



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Desarrollar un recubrimiento de BIO-Hidroxiapatita nanométrica de hueso trabecular de bovino en titanio mediante un proceso de deposición en frío a fin de obtener un buen anclaje del biocerámico en el sustrato.

### 4.2 Objetivos particulares

1. Obtener nano hidroxiapatita de hueso trabecular de bovino por medio de un proceso hidrotérmico y de calcinación para la obtención de agregados nanométricos.
2. Caracterizar los agregados de BIO-Hidroxiapatita por medio de técnicas fisicoquímicas para determinar las propiedades y características del refuerzo de la película.
3. Caracterizar el sustrato de titanio mediante difracción de rayos X para determinar la composición del material.
4. Modificar la superficie del titanio mediante Escritura de Láser Directa para obtener la rugosidad en el material.
5. Caracterizar el sustrato de titanio surcado por medio de microscopía electrónica de barrido para analizar los cambios morfológicos con respecto al sustrato inicial.
6. Desarrollar e implementar un recubrimiento en frío de BIO-Hidroxiapatita nanométrica por medio la deposición en frío para la corroboración del método desarrollado y posible implementaciones odontológicas.
7. Caracterizar las películas recubiertas a través de técnicas fisicoquímicas para estudiar el anclaje de la nano BIO-Hidroxiapatita en el titanio.

## 5 MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 5.1 Materiales

Los materiales utilizados en el presente trabajo fueron:

- Agua destilada obtenida del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro.
- Alcohol isopropílico ( $C_3H_8O$ ),  $\geq 99.5\%$  marca J.T. Baker.
- Hidróxido de potasio (KOH),  $\geq 84.0\%$  marca SIGMA-ALDRICH.
- Hueso trabecular de fémur de bovino de la carnicería de Álvaro Obregón s/n de San Juan del Río, Querétaro.
- Titanio proveniente del estado de Michoacán.

### 5.2 Metodología

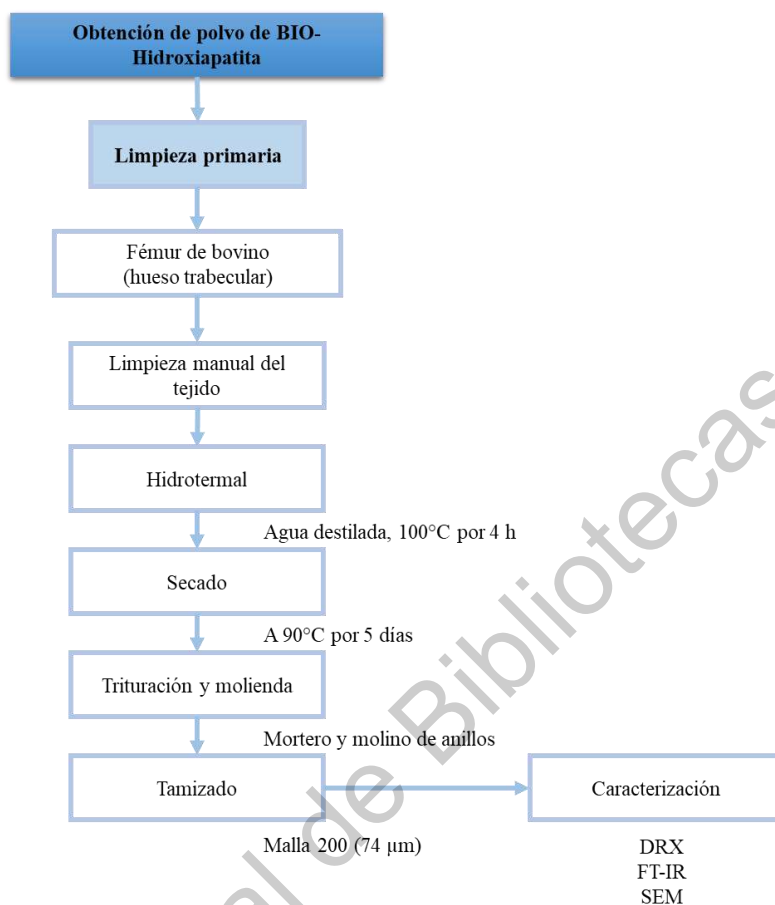
#### 5.2.1 Metodología 1 (Nano BIO-Hidroxiapatita)

Para la obtención de polvo de hueso de bovino se utilizó un pretratamiento de la metodología reportada por Ramirez-Gutierrez et al. (2017), mientras que para la obtención de BIO-Hidroxiapatita nanométrica se empleó la metodología de Zubieta (2020).

El proceso se explicará en dos etapas diferentes.

##### 5.2.1.1 Obtención de polvo de BIO-Hidroxiapatita

La obtención del polvo de BIO-Hidroxiapatita sigue el diagrama de flujo de la *Figura 5.1*, en donde a pesar de sólo referirse a la limpieza primaria como subetapa, también se cataloga a la trituración, molienda y tamizado como otra.

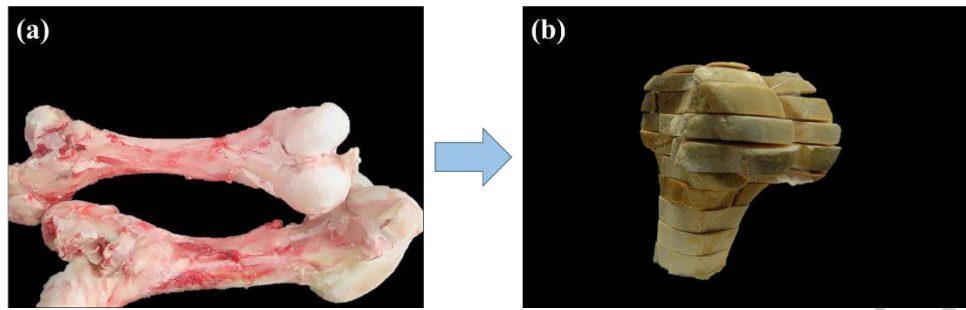


**Figura 5.1.** Diagrama de flujo de obtención de BIO-Hidroxiapatita.

#### 5.2.1.1.1 Limpieza primaria

Primeramente hacemos una limpieza primaria del hueso de bovino que se adquirió, teniendo como objetivo conservar solo el hueso trabecular en forma de placas para que la limpieza sea más sencilla.

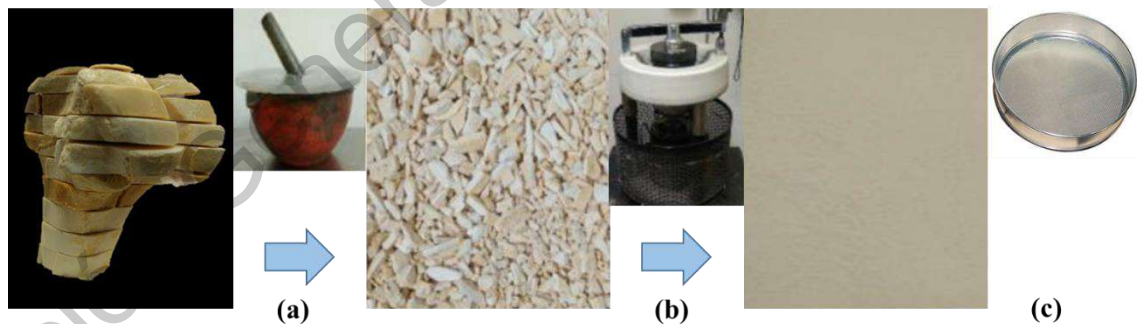
Se inicia con la remoción manual de toda la materia blanda. Para facilitar esta limpieza se llevó a cabo una cocción por cuadruplicado en agua destilada durante 1 h, mientras se cambiaba el agua destilada en cada repetición. Terminando la cocción se removió de manera completa todo el tejido blando restante visible en el hueso. Posteriormente se dejó secar al en una incubadora marca MMM modelo Incucell IC 55 a temperatura constante de 90°C durante 5 días, para después realizar la molienda y tamizado (Figura 5.2).



**Figura 5.2.** Limpieza primaria: (a) Fémur antes de la limpieza y (b) hueso trabecular después de la limpieza.

#### 5.2.1.1.2 Trituración, molienda y tamizado

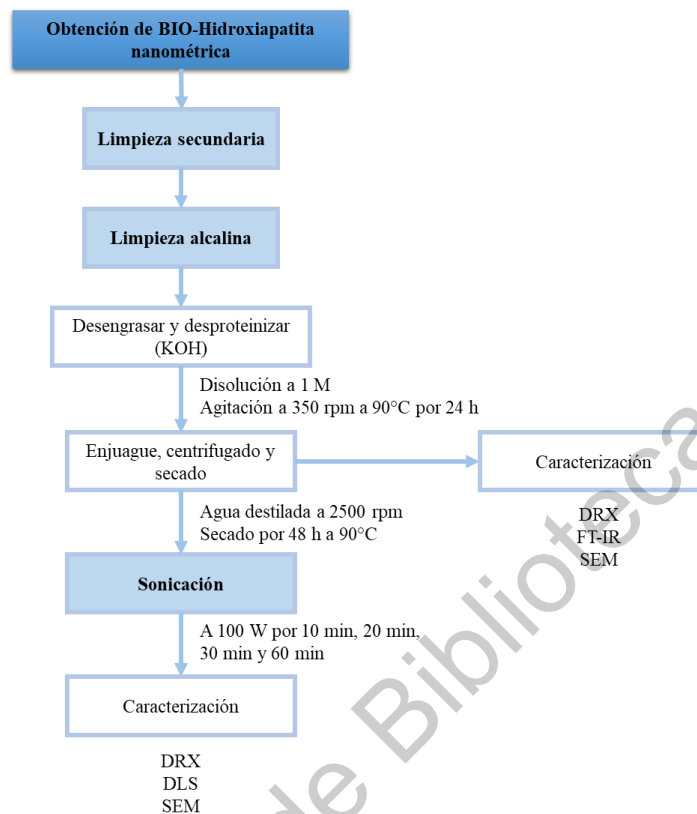
El hueso trabecular de bovino seco se trituro con la ayuda de un mortero metálico para rocas en partículas menores a 5 mm, para después ser triturado en un molino oscilatorio con anillos de carburo de tungsteno Pulverisette 9 marca Laval Lab del laboratorio de molienda del Centro de Geociencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, con capacidad de hasta 80 g por carga por 3 minutos. Finalmente, se consiguió polvo de hueso que fue tamizado en una malla número 200, que permite el filtrado de partículas menores a  $74 \mu$  (Figura 5.3).



**Figura 5.3.** Obtención de polvo: (a) Trituración, (b) molienda y (c) tamizado.

#### 5.2.1.2 Obtención de BIO-Hidroxiapatita nanométrica

Para generar nanopartículas de BIO-Hidroxiapatita con el polvo obtenido de la limpieza primaria, se necesita pasar por una limpieza secundaria dividida en limpieza alcalina y sonicación (Figura 5.4).



**Figura 5.4.** Diagrama de flujo de obtención de agregados nanométricos de BIO-Hidroxiapatita.

#### 5.2.1.2.1 Limpieza secundaria

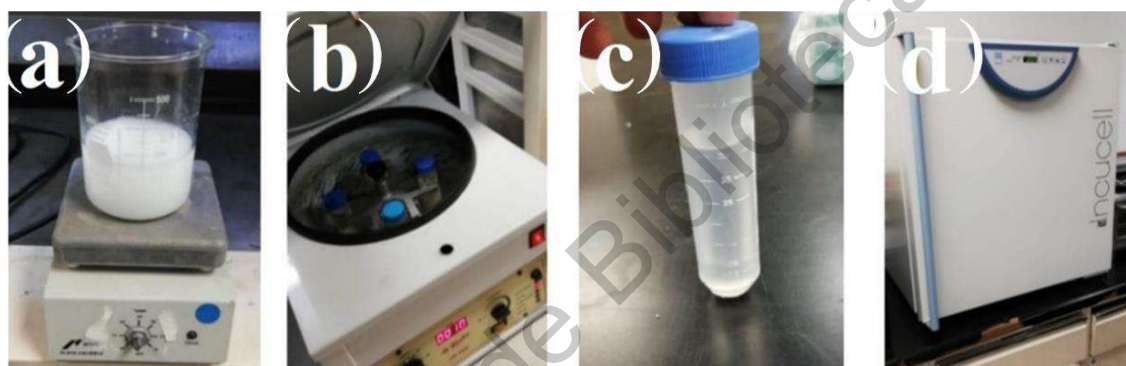
El polvo obtenido se procesa a una segunda etapa que consiste en dos subetapas.

##### 5.2.1.2.1.1 Limpieza alcalina

La primera parte de la segunda etapa inicia con mezclar el polvo de hueso en una disolución alcalina para desengrasarlo y desproteinizarlo (quitar grasas y proteínas), para esto se utilizó una sal básica que contiene iones afines a la estructura de la BIO-Hidroxiapatita, esta es hidróxido de potasio (KOH).

Se usaron 200 mililitros de agua destilada a los cuales se les agregó 11.2211 g de KOH, obteniendo de esta manera una molaridad de 1 M para la disolución. Posteriormente se añadieron 40 g de polvo de hueso (durante los enjuagados y centrifugados se puede perder material).

1. Se dejó la disolución a una agitación constante de 350 rpm por 24 h a 90°C y tapada, en un agitador magnético Felisa modelo FE-310 (*Figura 5.5a*).
2. Se centrifugo el resultado del paso uno a 2500 rpm por 15 min utilizando una centrifuga marca Rolco modelo CM 4080, para posteriormente enjuagarlo con agua destilada. Para eliminar la mayor cantidad de alcalino en la limpieza el paso 2 se repitió 10 veces (*Figura 5.5(a-b)*).
3. Finalmente, se secaron las muestras en una incubadora marca MMM modelo Incucell IC 55 por 48 h a 90°C (*Figura 5.5c*).



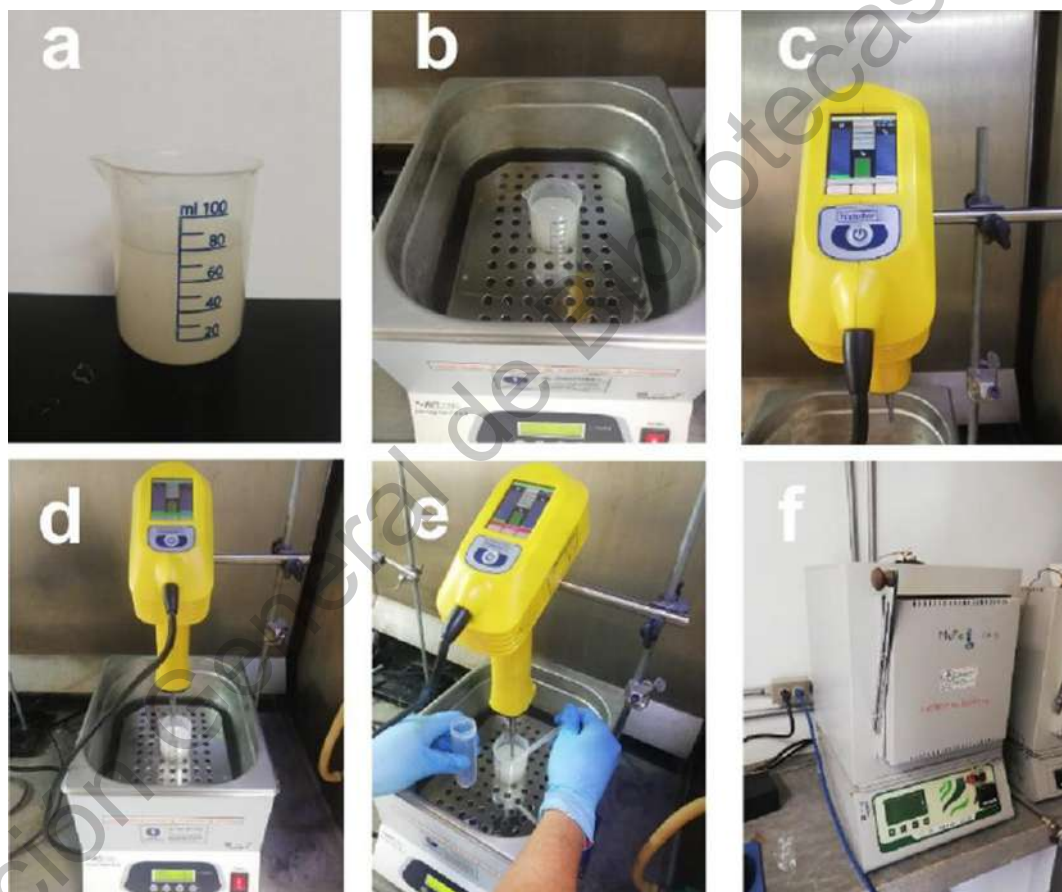
**Figura 5.5.** Limpieza alcalina: (a) Agitación, (b) centrifugado, (c) enjuague y (d) secado.

#### 5.2.1.2.1.2 *Sonicación*

La realización de sonoquímica se hizo mediante un homogeneizador ultrasónico modelo UP200HT marca Hielscher usando un sonotrodo S26d7 de titanio y diámetro de 7 mm. La muestra se procesó a una potencia de 100 W durante 10 min, 20 min, 30 min y 60 min, en donde:

1. Se utilizó un vaso de precipitados en el cual se agregaron 80 mL de alcohol isopropílico y 1 g de polvo de hueso trabecular de bovino desengrasado y desproteinizado (*Figura 5.6a*).
2. El vaso de precipitados se colocó en un baño maría en frío con agitación a 80 rpm en el 10L Stirring Water Bath, serie SWB (*Figura 5.6b*).
3. Se armó el sonicador en un soporte universal (*Figura 5.6c*).
4. Empezó la sonicación de 10 min (*Figura 5.6d*).

5. Se tomaron 15 mL del resultado del paso cuatro y se siguió con los 10 min para la segunda muestra (20 min), realizando el mismo procedimiento para los 30 min y 60 min (*Figura 5.6e*).
6. Finalmente, se decantaron y centrifugaron (centrifuga marca Rolco modelo CM 4080) las muestras resultantes (BIO-Hidroxiapatita nanométrica y alcohol isopropílico) desechado el solvente, para posteriormente secar las muestras en una mufla eléctrica digital 12,3 L Felisa FE-361 a 120°C por 3 h (*Figura 5.6f*).

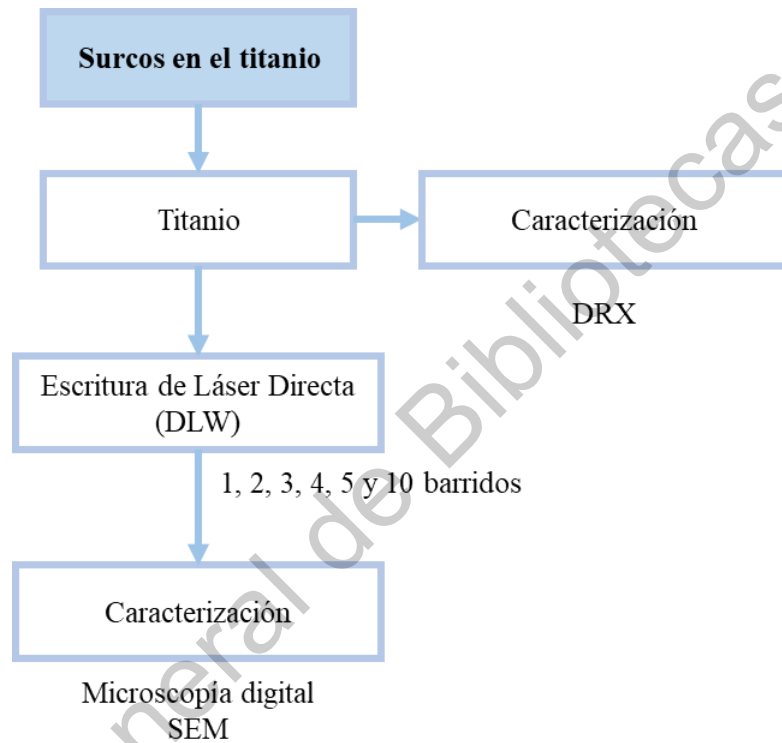


**Figura 5.6.** Obtención de BIO-Hidroxiapatita nanométrica: (a) Disolución, (b) baño maría en frío, (c) ultrasonido, (d) sonicación, (e) muestreo y (f) secado.

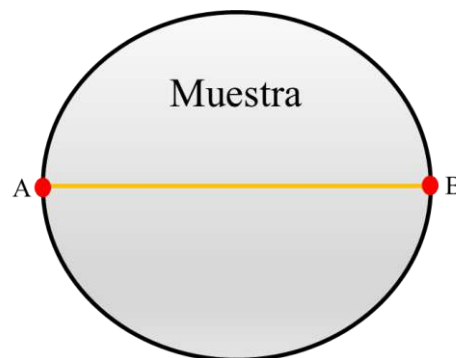
### 5.2.2 Metodología 2 (Grabado en titanio)

El titanio utilizado se obtuvo del estado de Michoacán. Primeramente se caracterizó por medio de DRX para conocer su tipo. Posteriormente se grabó el titanio de seis maneras

distintas, en donde la única diferencia es la cantidad de barridos entre cada muestra, es decir, el número de veces que el láser realizó un trazado del punto A al punto B y de regreso (ver la *Figura 5.8*). Las cantidades de barridos fueron 1, 2, 3, 4, 5 y 10, los cuales se produjeron por medio de Escritura de Láser Directa (DLW) mediante un láser marca HANS modelo YLP-MDF-152 (*Figura 5.9*) a 50 W.

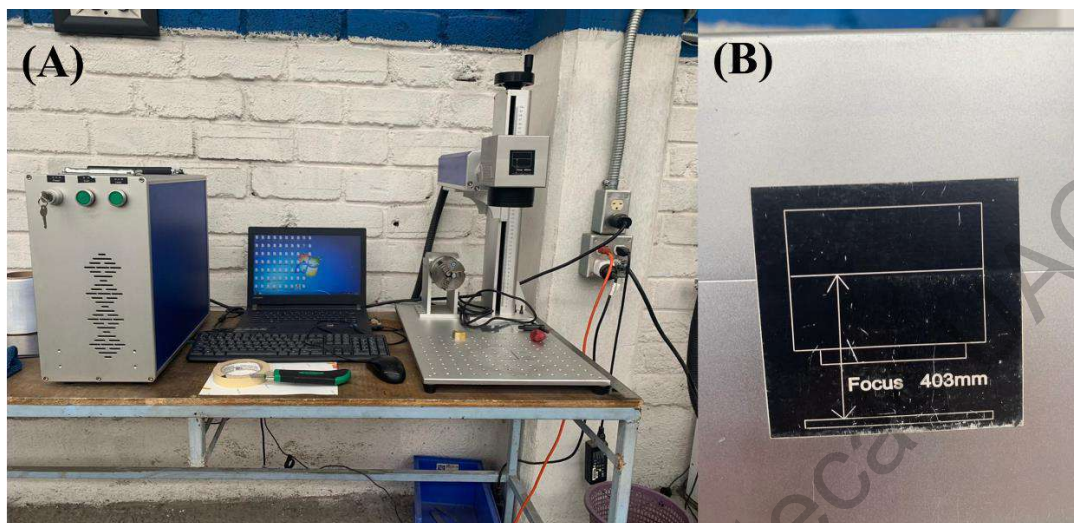


**Figura 5.7.** Diagrama de flujo de obtención de los surcos en el titanio.



**Figura 5.8.** Línea seguida por el láser HANS modelo YLP-MDF-152.



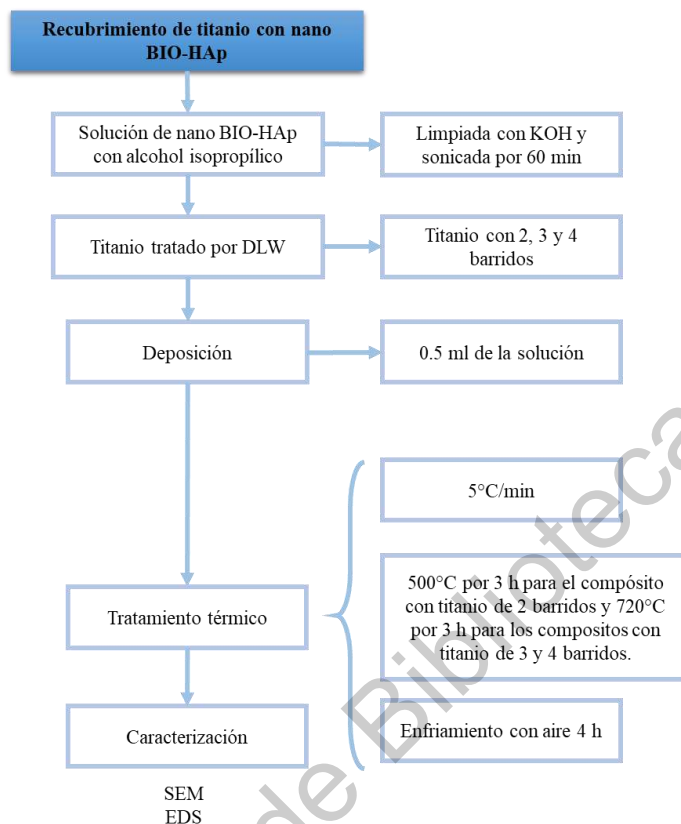


**Figura 5.9.** Se puede observar (A) el láser HANS YLP-MDF-152 y (B) la distancia del foco a la muestra (403 mm).

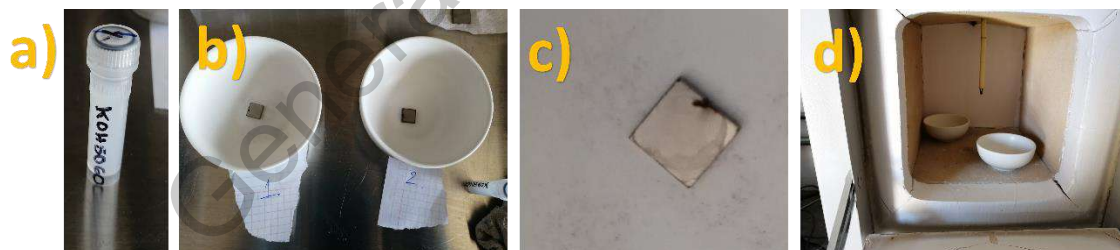
### 5.2.3 Metodología 3 (Recubrimiento de titanio con nano BIO-Hidroxiapatita)

Para el recubrimiento del titanio con BIO-HAP se utilizó la solución obtenida en la metodología 1, es decir, BIO-Hidroxiapatita nanométrica en alcohol isopropílico limpiada por KOH y sonicada durante 60 min (muestra no decantada) (ver *Figura 5.10.*).

1. Con ayuda de una pipeta graduada de 3 mL se tomaron los 0.5 mL de solución (*Figura 5.11a*).
2. Cada una de las muestras de titanio tratadas por DLW se colocaron en un crisol de porcelana, en donde se le depositó a cada una 0.5 mL de solución (*Figuras 5.11(b-c)*).
3. Posteriormente, el Ti con la solución de nano BIO-HAP pasó por un proceso térmico en una mufla eléctrica digital 12,3 L Felisa FE-361, la cual aumentaba 5°C cada minuto hasta alcanzar los 500°C, para la muestra de titanio con 2 barridos (muestra Ti HAp02), y los 720°C para las muestras de titanio con 3 y 4 barridos (muestras Ti HAp03 y Ti HAp04 respectivamente); donde se mantuvo por 3 h, posteriormente se dejó enfriar por aire durante 4 h (*Figura 5.11d*).



**Figura 5.10.** Diagrama de flujo del recubrimiento de titanio con nano BIO-HAp.



**Figura 5.11.** Recubrimiento de BIO-HAp en titanio: (a) Solución de nano BIO-HAp con alcohol isopropílico; (b) muestras de titanio tratado con 3 y 4 barridos; (c) deposición en la muestra de Ti con 2 barrido y (d) tratamiento térmico.

### 5.3 Técnicas de caracterización

Las muestras caracterizadas se muestran en la *Tabla 5.1*.

**Tabla 5.1.** Muestras que se caracterizaron.

Material	Muestra	Característica
BIO-Hidroxiapatita	B-RAW	Polvo en crudo de BIO-HAp.
	B-KOH	Polvo de BIO-HAp únicamente limpiado por KOH.
	B-KOH-10	Polvo de BIO-HAp con limpieza alcalina y sonicado por 10 min.
	B-KOH-20	Polvo de BIO-HAp con limpieza alcalina y sonicado por 20 min.
	B-KOH-30	Polvo de BIO-HAp con limpieza alcalina y sonicado por 30 min.
	B-KOH-60	Polvo de BIO-HAp con limpieza alcalina y sonicado por 60 min.
Titanio	Titanium	Titanio sin ningún tipo de tratamiento.
	Ti-1	Titanio tratado por DLW con 1 barrido.
	Ti-2	Titanio tratado por DLW con 2 barridos.
	Ti-3	Titanio tratado por DLW con 3 barridos.
	Ti-4	Titanio tratado por DLW con 4 barridos.

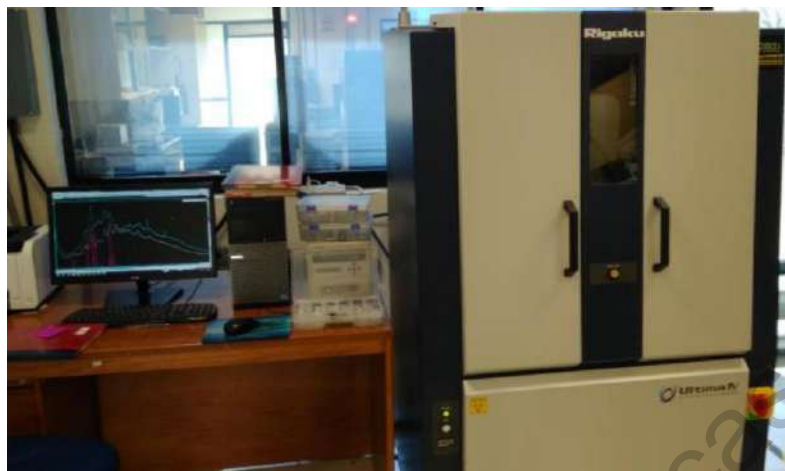
	Ti-5	Titanio tratado por DLW con 5 barridos.
	Ti-6	Titanio tratado por DLW con 10 barridos.
Compósito de titanio con BIO-Hidroxiapatita	Ti HAp02	Compósito de Ti-2 con B-KOH-60 calcinado a 500°C.
	Ti HAp03	Compósito de Ti-3 con B-KOH-60 calcinado a 720°C.
	Ti HAp04	Compósito de Ti-4 con B-KOH-60 calcinado a 720°C.

### 5.3.1 Difracción de rayos X (DRX)

Se utilizó la técnica de difracción de rayos X para determinar la composición, estructura y pureza del material del titanio, mientras que en la BIO-Hidroxiapatita se usó para determinar las fases cristalinas y los cambios de la calidad del cristalina mediante el estudio del cambio en la anchura a media altura (Full Width at the Half Maximum, FWHM). Todas las muestras a caracterizar se colocaron densamente en un soporte de silicio modo zero background, en tanto que los patrones de difracción se obtuvieron mediante un difractómetro de rayos X Ultima IV de la marca Rigaku (*Figura 5.12*), el cual funciona a 30 mA con una longitud de onda de radiación de  $\text{CuK}\alpha$  de  $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$  y a 40 kV. Los difractogramas fueron tomados de  $5^\circ$  a  $80^\circ$  utilizando la escala de  $2\theta$  y un tamaño de paso de  $0.02^\circ$ . Las muestras estudiadas fueron:

- Titanio: Titanium.
- Polvos: B-RAW y B-KOH.
- BIO-Hidroxiapatita nanométrica: B-KOH-10, B-KOH-20, B-KOH-30 y B-KOH-60.

No se caracterizaron las muestras de titanio tratadas por DLW ya que solamente se quería conocer el tipo de Ti que se utilizó en el trabajo.



**Figura 5.12.** Difractómetro de Rayos X marca Rigaku modelo Ultima IV.

### 5.3.2 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Para la identificación de los diferentes grupos funcionales que se encuentran en las muestras de BIO-Hidroxiapatita nanométrica y nano hidroxapatita sintética se realizó en un equipo de IR modelo Spectrum Two de la marca Perkin Elmer (*Figura 5.13*) espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier. Se caracterizaron las muestras en forma de polvo mediante reflexión total atenuada (ATR) con 32 repeticiones, en un rango de número de onda de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $600\text{ cm}^{-1}$  y resolución de  $2\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras estudiadas fueron B-RAW y B-KOH.

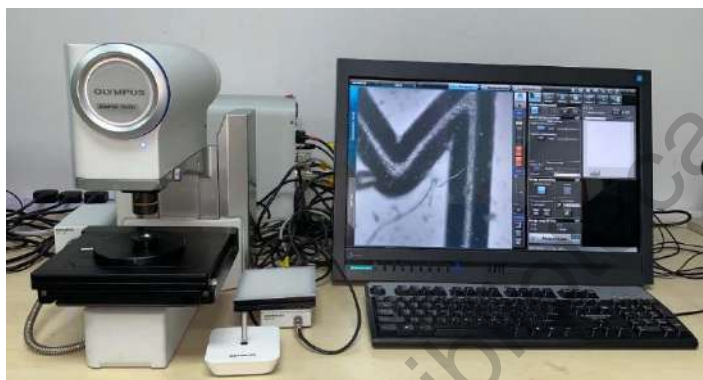
Se optó por solamente caracterizar estas muestras puesto que se quiso observar únicamente la forma en que beneficia la limpieza alcalina a la BIO-HAp en crudo.



**Figura 5.13.** Espectrofotómetro FT-IR-ATR de la marca Perkin Elmer modelo Spectrum Two.

### 5.3.3 Microscopia Digital

Para el análisis de rugosidad de la muestra de titanio poroso se utilizó un microscopio digital de la marca Olympus modelo DSX510 (Figura 5.14). Para esto se trazó una línea de 1 mm de espesor perpendicular a los surcos formados por el láser ya que los parámetros se calculan sobre esta línea. En donde las muestras analizadas fueron Ti-1, Ti-2, Ti-3, Ti-4, Ti-5 y Ti-6.



**Figura 5.14.** Microscopio Digital Olympus DSX510.

### 5.3.4 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

El tamaño de partícula se estudió mediante un analizador de tamaño de partícula de la marca Anton Paar modelo Litesizer 500 (Figura 5.15). Únicamente en las muestras de BIO-Hidroxiapatita nanométrica (B-KOH-10, B-KOH-20, B-KOH-30 y B-KOH-60) para garantizar que a través de la sonicación se pueden obtener nanopartículas de BIO-HAp. Estas se midieron en una disolución de alcohol isopropílico que fueron dispersadas en un baño ultrasónico Baku BK-9050 durante 5 minutos. Posteriormente se colocaron 2 mL de muestra en una celda desechable (otorgadas por la compañía del analizador). Donde los parámetros observados se ajustaron automáticamente por el software Kalliope, cambiando únicamente:

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



**Figura 5.15.** Analizador de tamaño de partícula marca Anton Paar modelo Litesizer 500.

### 5.3.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para los análisis morfológicos se ocuparon tres diferentes modelos de microscopios electrónicos de barrido. Para las muestras B-RAW y B-KOH se utilizó el microscopio electrónico de barrido JSM-6060 LV de la marca JEOL (*Figura 5.16*), en el cual las mediciones se llevaron a cabo con un voltaje de 10 kV, mientras que las muestras se fijaron en porta muestras de cobre con cinta de carbono cubiertas de una fina película de oro, esto último para promover la conducción antes de realizar la caracterización.

Únicamente para observar la diferencia morfológica entre el polvo en crudo de BIO-HAp y el resultado de la limpieza alcalina.



**Figura 6.16.** Microscopio electrónico de barrido, JEOL JSM-6060 LV.



Sin embargo, para las muestras de BIO-Hidroxiapatita nanométrica (B-KOH-10, B-KOH-20, B-KOH-30 y B-KOH-60) la caracterización se realizó a través del microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-7401 F (*Figura 5.17*) empleando un voltaje de 2kV y 5 kV para la BIO-HAp, en tanto que las muestras se colocaron en un pedazo de silicio cristalino montado sobre el porta muestras del microscopio mediante una gota de pintura de plata, esto se debe al alto voltaje con el que se trabajó.

Con el objetivo de observar con una mayor claridad las nanopartículas y aglomerados de nano BIO-HAp conseguidos como resultado de la sonicación de muestras limpiadas por KOH.



**Figura 5.17.** Microscopio electrónico de barrido, JEOL JSM-7401 F.

Por último, se utilizó un microscopio electrónico de barrido de alta resolución (HR-SEM, por sus siglas en inglés) de marca Hitachi modelo SU8230 (*Figura 5.18*) para caracterizar las muestras de titanio poroso y el compósito entre la BIO-Hidroxiapatita y el titanio poroso, ya que era de mayor interés tener una mejor resolución a fin de realizar un mejor análisis para la porosidad del titanio y el anclaje de las semillas de nano BIO-HAp. Las muestras se montaron sobre un porta muestras de aluminio y se pegaron con una cinta de carbón. El voltaje de aceleración utilizado para el estudio fue de 15 kV y 20 kV. Se identificaron como Ti-1, Ti-2, Ti-3, Ti-4, Ti-5, Ti-6, Ti HAp02, Ti HAp03 y Ti HAp04.





**Figura 5.18.** Microscopio electrónico de barrido, Hitachi SU8230.

### **5.3.6 Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersiva (EDS)**

El análisis elemental para estudiar de una mejor manera el anclaje de la BIO-Hidroxiapatita en el titanio se hizo utilizando el equipo de EDS Bruker X Flash 6/60 acoplado a un Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo de cátodo frío Hitachi SU8230 (Figura 5.18) operando a 20 kV. Las muestras se montaron sobre un porta muestras de aluminio y se pegaron con una cinta de carbón.

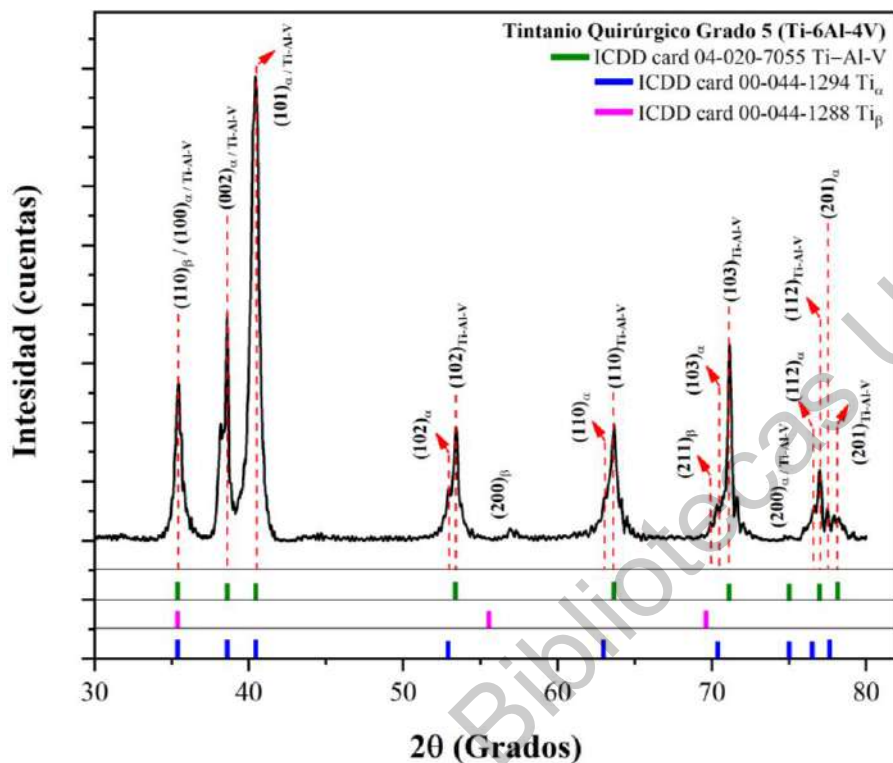
Los elementos identificados fueron el titanio, ya que es el material a recubrir, fosforó y calcio, al ser los que tienen mayor concentración en la BIO-HAp, y oxígeno, este último ya que también tiene gran presencia en el cerámico y posiblemente en el titanio surcado. Se identificaron las muestras Ti HAp02, Ti HAp03 y Ti HAp04.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1 Difracción de rayos X (DRX)

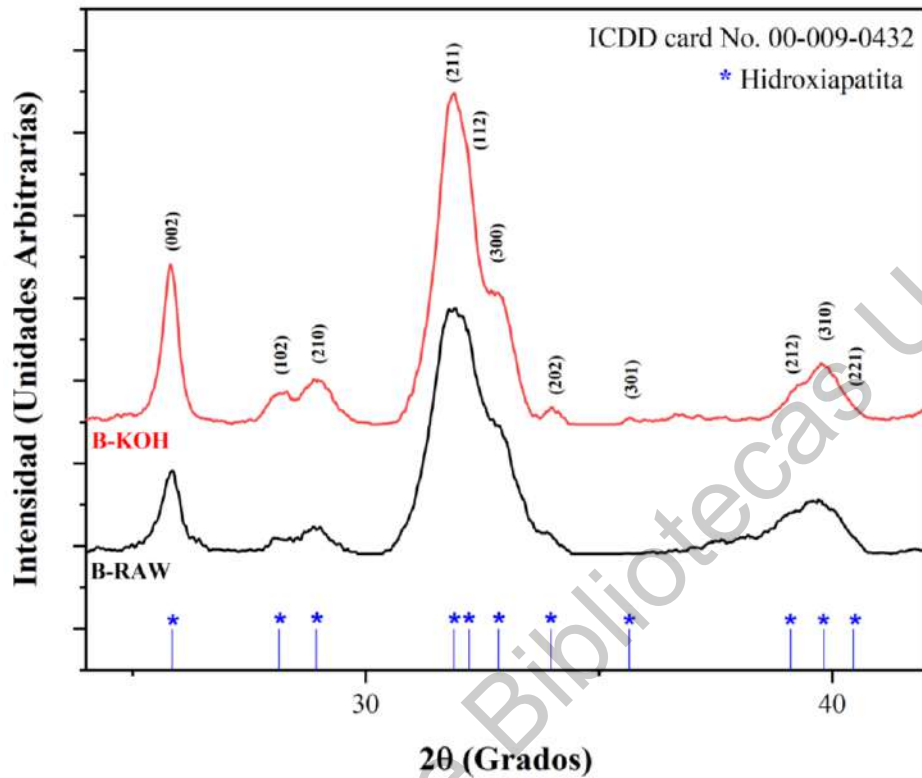
Primeramente, se caracterizó el titanio (muestra Titanium) originario de Michoacán para determinar el tipo de Ti. La difracción de rayos X arrojó información para conocer la estructura del cristal y fases cristalinas, tal cual y se observa en la *Figura 6.1*. La muestra se identificó con las cartas ICDD (International Center for Diffraction Data) No. 00-044-1288 (titanio en fase  $\beta$ ), No. 00-044-1294 (titanio en fase  $\alpha$ ) (Da Silva et al., 1999) y No. 04-020-7055 (equivalente a una aleación entre titanio, aluminio y vanadio), por lo que asegura que es titanio quirúrgico de grado 5 (Ti-6Al-4V) (Da Silva et al., 1999), el cual tiene un UNS de R56400 (Unified Numbering System). A su vez, el Ti-6Al-4V es una aleación de titanio  $\alpha$ - $\beta$  compuesto principalmente (en peso) de titanio, 6% de aluminio, 4% de vanadio, un máximo de 0.25% de hierro, un máximo de 0.10% de carbono, un máximo de 0.02% de nitrógeno, 0.015% máximo de hidrogeno, un máximo residual de cada uno de 0.10% y un máximo residual total de 0.40% (ASTM, 2013).

La muestra presenta una señal bastante ruidosa, esto se atribuye a ruido instrumental.



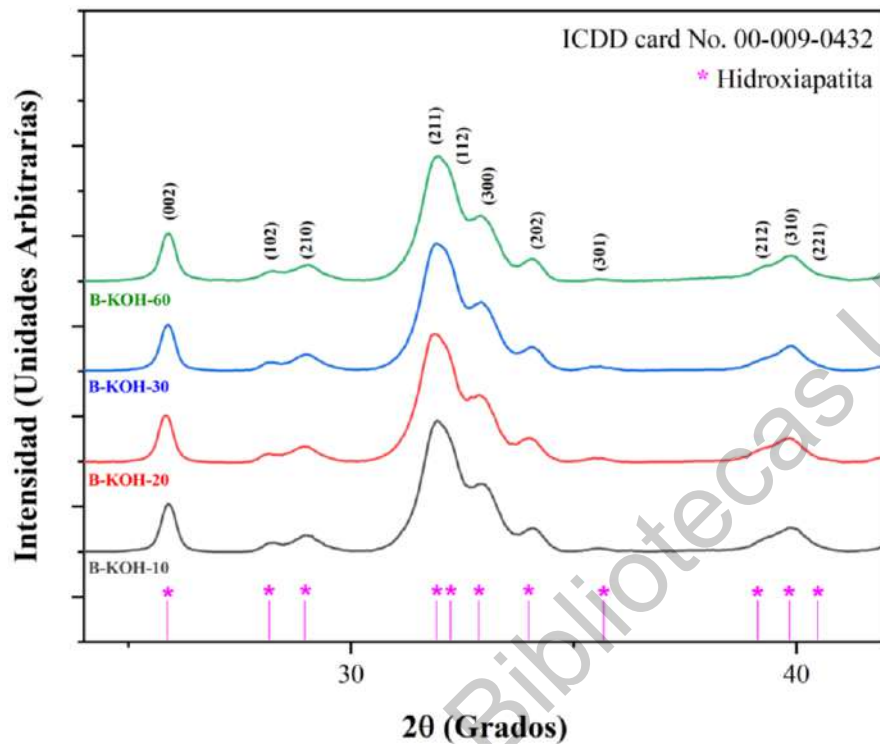
**Figura 6.1.** Difractograma de titanio quirúrgico grado 5 (Ti-6Al-4V).

Por otro lado, la difracción de rayos X de BIO-Hidroxiapatita en crudo y a la que se le hizo la limpieza alcalina, B-RAW y B-KOH respectivamente, arrojó información con la que se verifica la fase cristalina de las muestras que se identificaron con la carta del ICDD No. 00-009-0432, en donde se puede observar que los picos de mayor intensidad fueron los planos (002), (211), (300) y (310). Las muestras presentan ruido generalmente propias de la fase orgánica (Jeronimo-Cruz, 2018). Aunque también puede atribuirse a un efecto de fluorescencia y dispersión por el tamaño de los granos de la BIO-HAp (Londoño-Restrepo, et al., 2019). La muestra B-RAW es la que manifiesta mayor contribución de la fase orgánica. Con la aplicación del tratamiento alcalino se puede observar el incremento de intensidad en los picos de los planos (002), (211), (300) y (310), lo que indica una disminución de la materia orgánica, por lo que los cristales de hidroxiapatita se podrían apreciar con mayor facilidad y observarse posibles aglomeraciones (Figura 6.2).



**Figura 6.2.** Difractograma de las muestras: B-RAW y B-KOH.

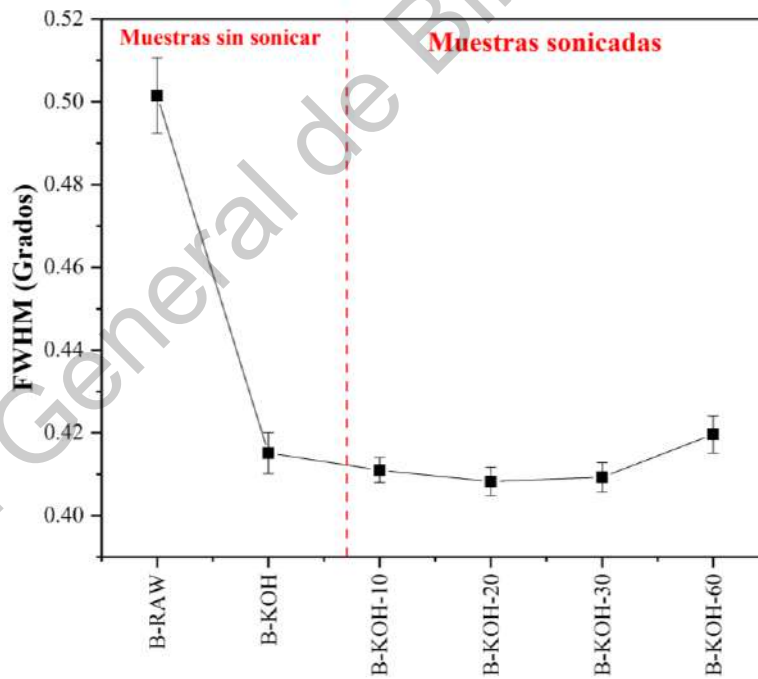
En la *Figura 6.3* se observan las muestras que se sonicaron a diferentes tiempos, en donde se pudo identificar la misma fase de hidroxiapatita utilizando la misma carta ICDD (00-009-0432) que las muestras B-RAW y B-KOH. En donde podemos observar que los picos de mayor intensidad siguen siendo los planos (002), (211), (300) y (310). Sin embargo, a comparación de la *Figura 6.2*, los que se muestran en la *Figura 6.3* son más limpios en virtud a que la sonicación puede afectar la materia orgánica residual al reducirla parcialmente debido a los procesos de cavitación (como se muestra en la sección 6.2). Igualmente, se podría atribuir el incremento de intensidad a la aglomeración y mejor apreciación de los cristales de hidroxiapatita.



**Figura 6.3.** Difractograma de las muestras: B-KOH-10, B-KOH-20, B-KOH-30 y B-KOH-60.

En la *Figura 6.4* se muestra el cambio de la anchura a media altura (FWHM) del pico que está alrededor de  $25.905^\circ$  que corresponde al plano (002) para cada uno de los patrones de DRX. Este valor se usa comúnmente para determinar la calidad cristalina de un material, en donde los valores altos están relacionados con una deficiente calidad cristalina o presencia de fases amorfas (Londoño-Restrepo et al., 2020). Sin embargo, como se verá en secciones posteriores (secciones 6.4 y 6.5), los cristales de hidroxiapatita de hueso trabecular de bovino son nanométricos. De acuerdo con Pinna (2005), cuando aumenta el tamaño del cristal los picos de difracción se hacen más estrechos, como es el caso de la hidroxiapatita después de la limpieza alcalina, como se mostrará en SEM. A su vez, Londoño-Restrepo, et al. (2019) también lo demostraron a través de una simulación utilizando el software PDF-4, en la pequeños incrementos de tamaños en los cristales producen cambios drásticos en la forma y ancho de los picos de difracción.

El cambio significativo del FWHM entre las muestras B-RAW y B-KOH corresponde a la remoción parcial de la materia orgánica debido a la limpieza alcalina. Mientras que las muestras que además de ser limpiadas fueron sonicadas durante 10 min, 20 min y 30 min son estadísticamente iguales, es decir, no existe un cambio aparente al tamaño de partícula. Por lo que se puede decir que el tamaño de cristal se mantiene de dimensiones nanométricas y solo se siente afectada la materia orgánica; a su vez, el cambio en la gráfica mostrada en la *Figura 6.4* entre la muestra B-KOH y las muestras sonicadas hasta los 30 min se podría argumentar al tomar como micropartícula el aglomerado de nanopartículas existentes en estas muestras. En tanto que en B-KOH-60 se observa un aumento del valor de la anchura a media altura, debido a que el tamaño de la hidroxiapatita es nanométrico, por lo que se puede colegir que en este punto el proceso de sonicación y la limpieza con KOH afecto directamente el tamaño de partícula.



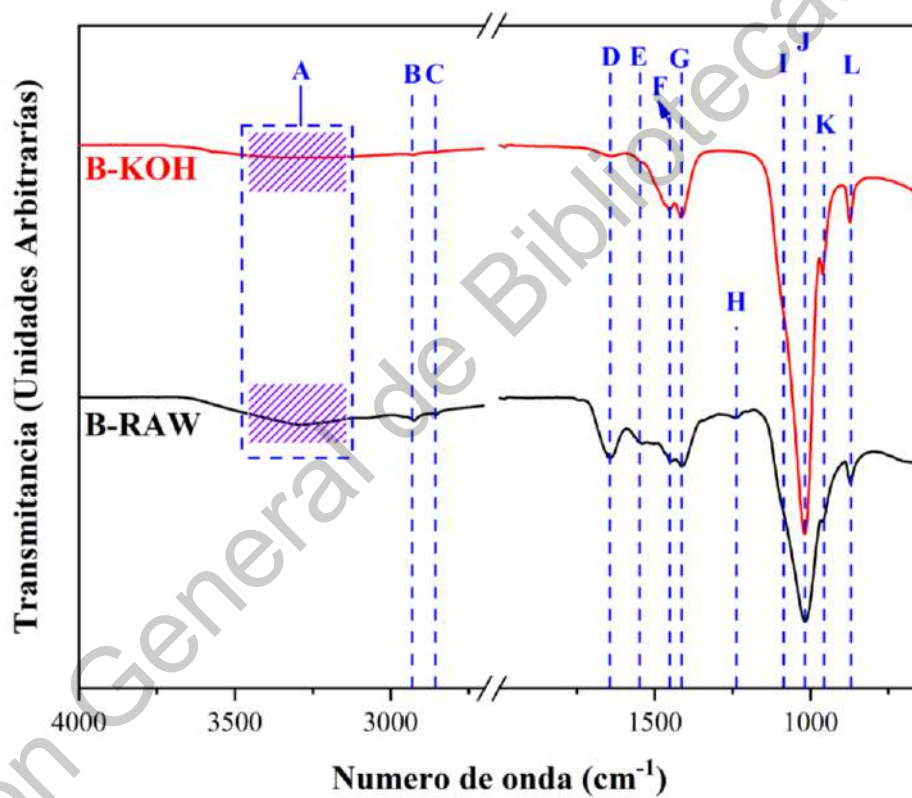
**Figura 6.4.** Cálculo de FWHM del plano (002) de todas las muestras de BIO-HAp.

## 6.2 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

El análisis de espectroscopia infrarroja se utiliza para indicar los grupos funcionales y poder identificar un material. Además, se logra identificar la remoción parcial de componentes

orgánicos. Lo que lleva a utilizar esta técnica para descubrir los cambios en las bandas características que se generaron en el proceso de limpieza.

En la *Figura 6.5* se observan los espectros de las muestras de hidroxiapatita B-RAW y B-KOH, en donde se pueden observar los distintos enlaces presentes en las muestras. En la *Tabla 6.1* se aprecian las bandas obtenidas en el análisis con su respectiva identificación, asignación, ubicación y referencia, esta última se utiliza para encontrar en la literatura el nombre del grupo funcional de cada banda.



**Figura 6.5.** Espectros de infrarrojo de HAp B-RAW y B-KOH.

Con respecto a la identificación, se puede encontrar el grupo carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$   $\nu_{3as}$ ) que funciona como un ion sustituyente en la estructura de las hidroxiapatitas (Londoño-Restrepo, et al., 2016), tal cual y se muestra en las bandas *F*, *G* y *L*. De igual modo, los grupos fosfatos característicos de las hidroxiapatitas están representados por las bandas *I*, *J* y *K* (Londoño-Restrepo, et al., 2016).

**Tabla 6.1.** Posiciones de las bandas de espectroscopia infrarroja en hidroxiapatita.

Grupo Funcional	Asignación	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )*	Número de onda (cm <sup>-1</sup> ) <sup>R</sup>	Referencias
O-H (Absorción de H <sub>2</sub> O)	ν	(A) 3100-3400 <sup>ab</sup>	3584, 3611	Giordanino, et al., 2014
			3100-3400	Jeronimo-Cruz, 2018
			3360	Londoño-Restrepo, Zubieta-Otero, Jeronimo-Cruz, Mondragon & Rodriguez-García, 2019
			3367	Bahrololoom, et al., 2009; Shaltout, et al., 2011
C-H	ν	(B) 2924 <sup>b</sup>	2925, 2854	Hawkes, et al., 2008
C-H	ν	(C) 2851 <sup>b</sup>	2953, 2850	Hou, et al., 2009
Amida I (C=O)	---	(D) 1639 <sup>ab</sup>	1642	Hawkes, et al., 2008; Hulbert, et al., 1972
			1670	Hernandez-Gil, et al., 2006
Amida II	---	(E) 1547 <sup>ab</sup>	1543	Hawkes, et al., 2008
			(F) 1448 <sup>ab</sup>	1417
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	ν <sub>3as</sub>	(G) 1414 <sup>ab</sup>	1454, 1412	Hawkes, et al., 2008
			1412, 1460	Hou, et al., 2009
			1430, 1457	Hulbert, et al., 1972
			(H) 1240 <sup>b</sup>	1240
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	ν <sub>3</sub>	(I) 1096 <sup>ab</sup>	1088, 1014	Hawkes, et al., 2008
			(J) 1017 <sup>ab</sup>	1043
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	ν <sub>1</sub>	(K) 959 <sup>ab</sup>	962	Hernandez-Gil, et al., 2006
			960	Hawkes, et al., 2008; Hou, et al., 2009
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	ν <sub>2as</sub>	(L) 870 <sup>ab</sup>	871	Hernandez-Gil, et al., 2006
			872	Hawkes, et al., 2008
			875	Hulbert, et al., 1972

\* *Este trabajo: a.- B-KOH. b.- B-RAW. R: Referencias.*

*Modos vibracionales: ν = tensión.*

La presencia de agua (grupo hidroxilo: O-H) es adquirida por la absorción de la humedad ambiental en las muestras B-RAW y B-KOH, este grupo funcional viene dado por la banda A. En las muestras de hidroxiapatita obtenida de manera biológica, las bandas B y C corresponden a los grupos alcanos relacionados con los lípidos derivados del huésped (bovino), los cuales se atenúan con la limpieza. Otras bandas que se deben eliminar o reducirse además de las C-H (indicadas por B y C), son las relacionadas con los grupos amida I, amida II y III (correspondientes a D, E y H); donde la única que desaparece por completo gracias al tratamiento alcalino de hidróxido de potasio es la banda H; mientras que las bandas D y E solamente reducen su intensidad, esto debido a que la limpieza alcalina solamente removió parcialmente de materia orgánica.

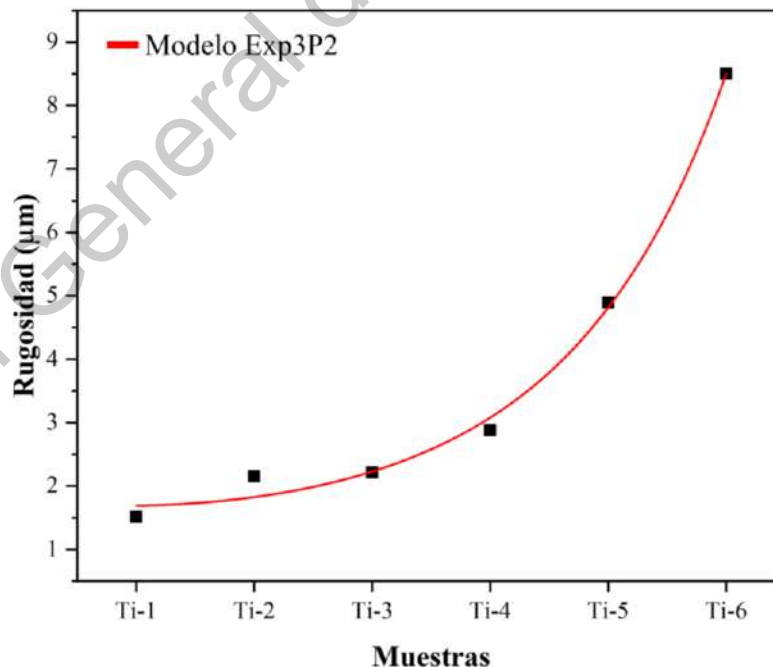


### 6.3 Microscopía Digital

Por microscopía digital se puede observar como aumenta la rugosidad conforme al número de barridos (*Figura 6.6*), esto lleva a que el titanio tenga irregularidades en su superficie, las cuales a su vez promueven la adhesión (Zhai et al., 2016). Sin embargo, la rugosidad llega a formar sitios de nucleación de grietas o corrosión (Zhai et al., 2016).

El aumento de rugosidad que tiene el Ti-6Al-4V conforme va creciendo el número de barridos es de manera exponencial (se utilizó el modelo Exp3P2 de Origin 2018, donde arrojó una  $R^2 = 0.9947$ ) (ver *Figura 6.6*), lo que implica que después de varios barridos el material comenzará a fracturarse.

Al observar la *Tabla 6.2* se puede argumentar que el incremento de la rugosidad del primer al segundo barrido es significativo, lo que llevaría a suponer que la creación de fracturas empezará desde los 2 barridos. A la par, la tendencia exponencial de la gráfica de la *Figura 6.6* sugiere la creación de grietas o corrosión a partir de los 3 barridos. Sin embargo, este estudio no es suficiente para determinar este cambio morfológico.



**Figura 6.6.** Aumento exponencial de la rugosidad con respecto a las muestras a diferentes recorridos.

**Tabla 6.2.** Rugosidad respectiva para cada muestra del titanio quirúrgico de grado 5.

Muestra	Número de barridos	Rugosidad ( $\mu\text{m}$ )
Ti-1	1	1.516
Ti-2	2	2.152
Ti-3	3	2.214
Ti-4	4	2.880
Ti-5	5	4.887
Ti-6	10	8.503

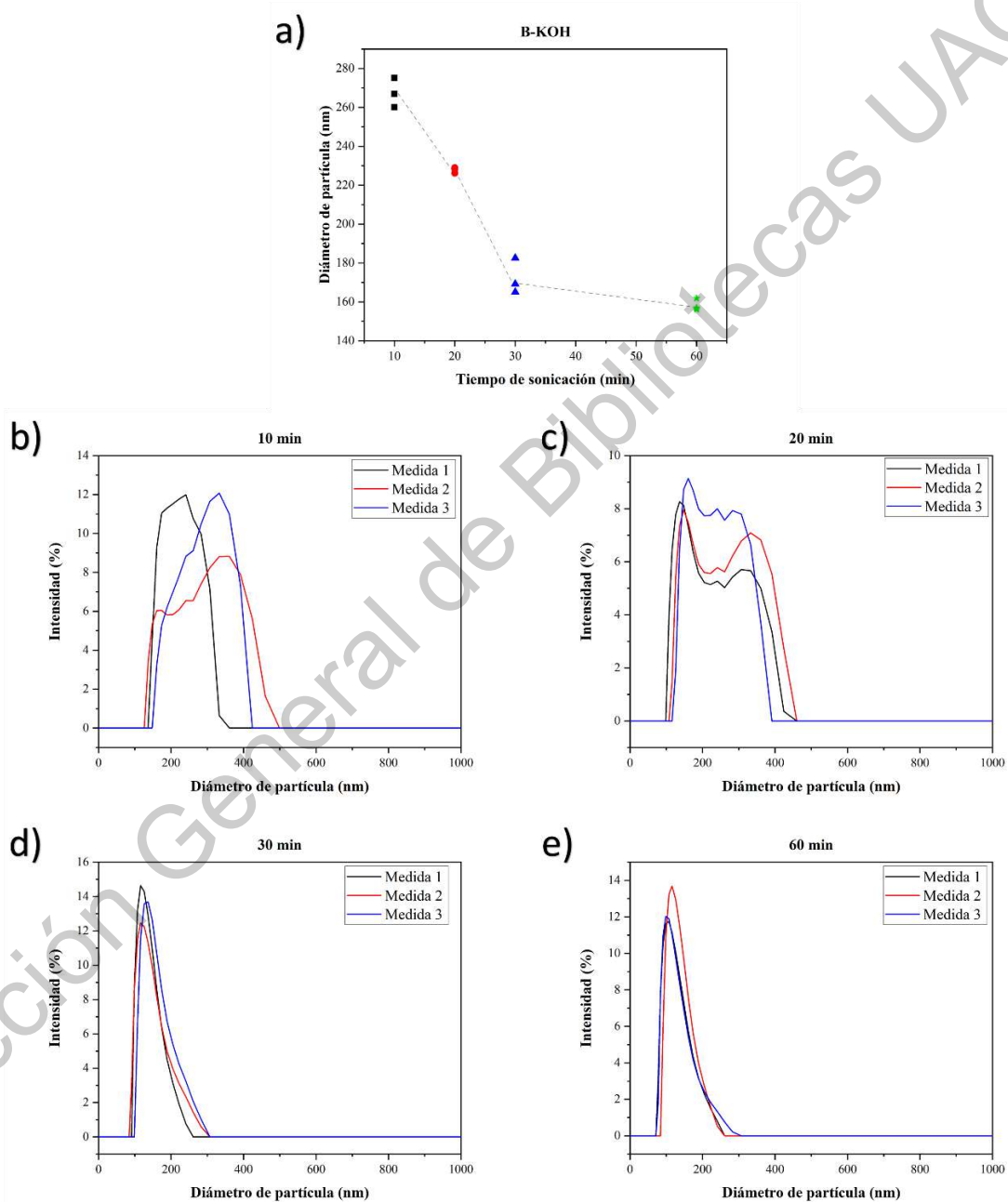
#### 6.4 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Verificada la remoción parcial de materia orgánica por medio del tratamiento alcalino, los polvos sonicados a 10 min, 20 min, 30 min y 60 min se analizaron mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS) para medir el tamaño de partícula.

En la *Figura 6.7a* se puede apreciar una tendencia decreciente mientras el tiempo de exposición aumentaba, es decir, un menor tamaño de partícula. Mientras que a los 10 min el tamaño promedio de las muestras oscila entre los 260 nm y 280 nm, a los 60 min está en el rango de los 160 nm. Sin embargo, estos valores son estimados, esto se debe a que no son partículas parcialmente esféricas o totales, por lo que en algunas muestras (B-KOH-10 y B-KOH-20) en algunos puntos son multimodal (*Figura 6.7(b-c)*) a pesar de que la intensidad de distribución se mantiene en los rangos de valores. En tanto las muestras de la *Figura 6.7(d-e)* presentan un patrón monomodal, dicho de una mejor manera, al aumentar el tiempo de exposición podemos encontrar tamaños hacia valores esféricos, por lo que el radio hidrodinámico tiende a ser ideal.

A su vez, estas últimas muestras presentan una polidispersidad baja, esto debido a que los valores del diámetro describen una amplitud estrecha en una región de la distribución gaussiana. Con lo que podemos concluir que existen una gran variedad de tamaños que van

desde los 150 nm y 280 nm, por lo que obtuvieron semillas de nano bio-hidroxiapatita (Figura 6.(7d-e)).



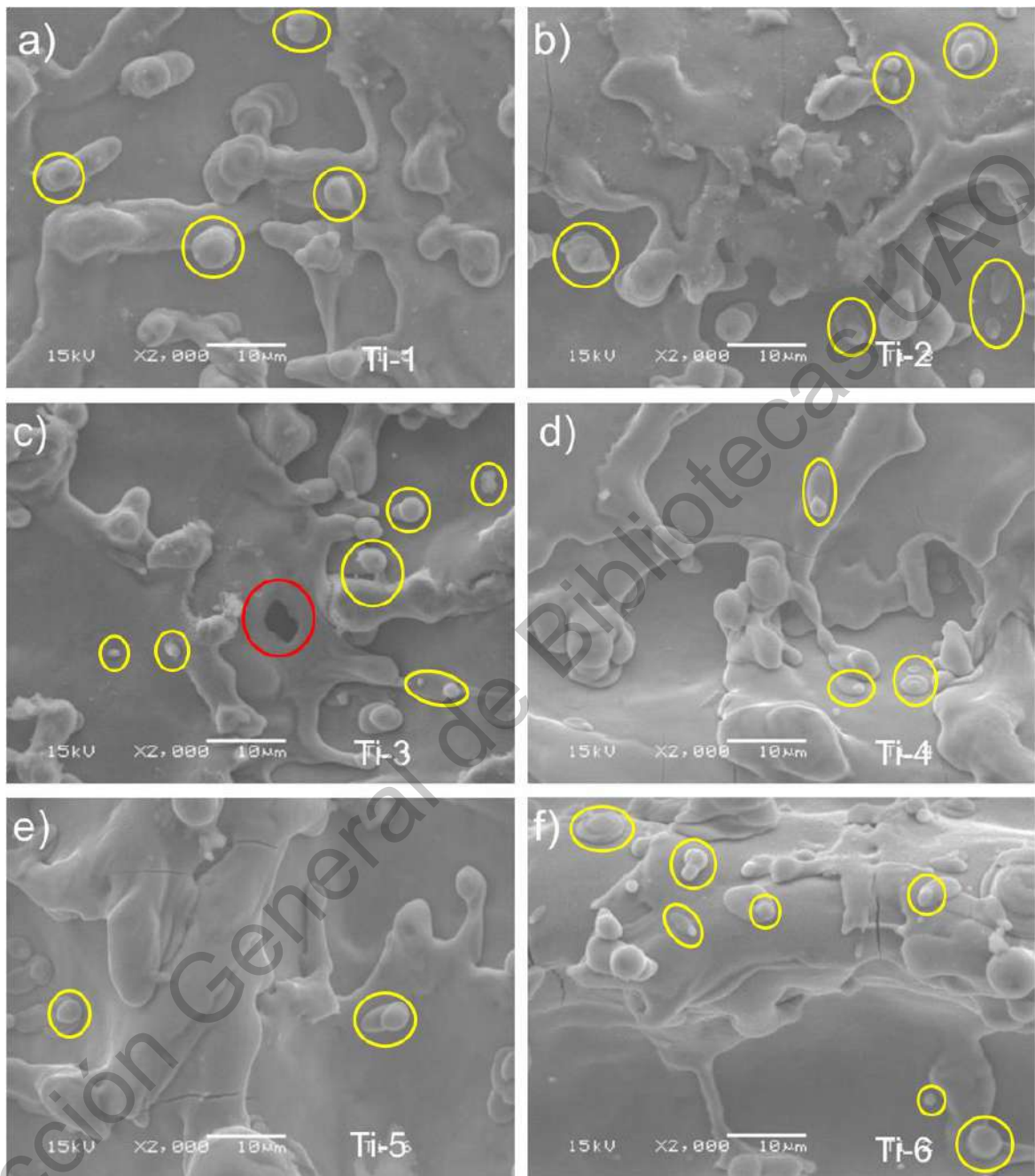
**Figura 6.7.** (a) Diámetro de partícula de B-KOH: (b) B-KOH-10, (c) B-KOH-20, (d) B-KOH-30 y (e) B-KOH-60.

## 6.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La caracterización morfológica para el titanio quirúrgico de grado 5 surcado que se realizó mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución permitió observar el efecto de la rugosidad sobre la superficie del material con respecto al número de recorridos.

Se puede observar la creación de surcos en el material con el aumento de barridos en el material (*Figura 6.8*). Mientras que con 1 barrido (*Figura 6.8a*) solamente se empieza a fundir el material y formarse una superficie llena de irregularidades, al aumentar este número se puede ver una clara formación de fracturas a lo largo del Ti-6Al-4V (*Figura 6.8(b-f)*), además de una evidente corrosión en el titanio quirúrgico a los 3 barridos como se muestra encerrada de color rojo en la *Figura 6.8c* y un surco más definido a los 10 barridos (*Figura 6.8f*).

Asimismo, se podría argumentar la generación de dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ), ya que durante el proceso de DLW no existió un atmosfera controlada, lo que llevo a la formación de pequeñas burbujas perceptibles, encerradas en color amarillo, a lo largo de los diferentes barridos (*Figura 6.8*).

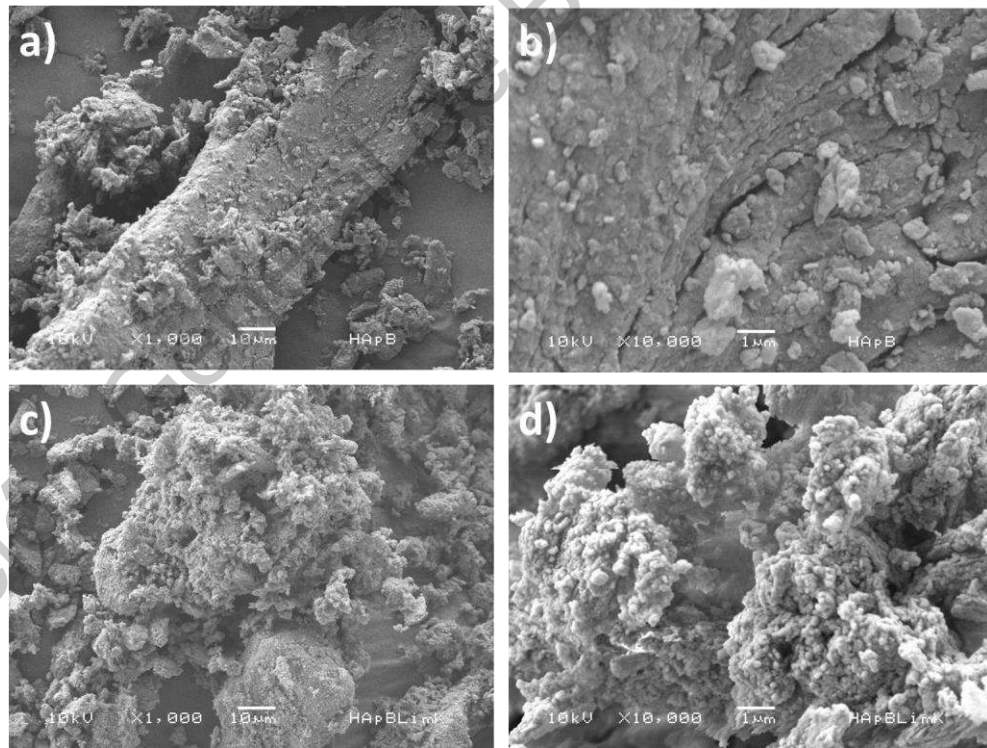


**Figura 6.8.** Imágenes HR-SEM, donde se puede ver la corrosión encerrada en color rojo y el  $\text{TiO}_2$  marcada en amarillo. (a) 1 barrido, (b) 2 barridos, (c) 3 barridos, (d) 4 barridos, (e) 5 barridos y (f) 10 barridos.

Por otro lado, en las muestras de BIO-Hidroxiapatita (*Figura 6.9*) a través de SEM se observa que la limpieza alcalina con hidróxido de potasio es eficiente en la remoción de materia

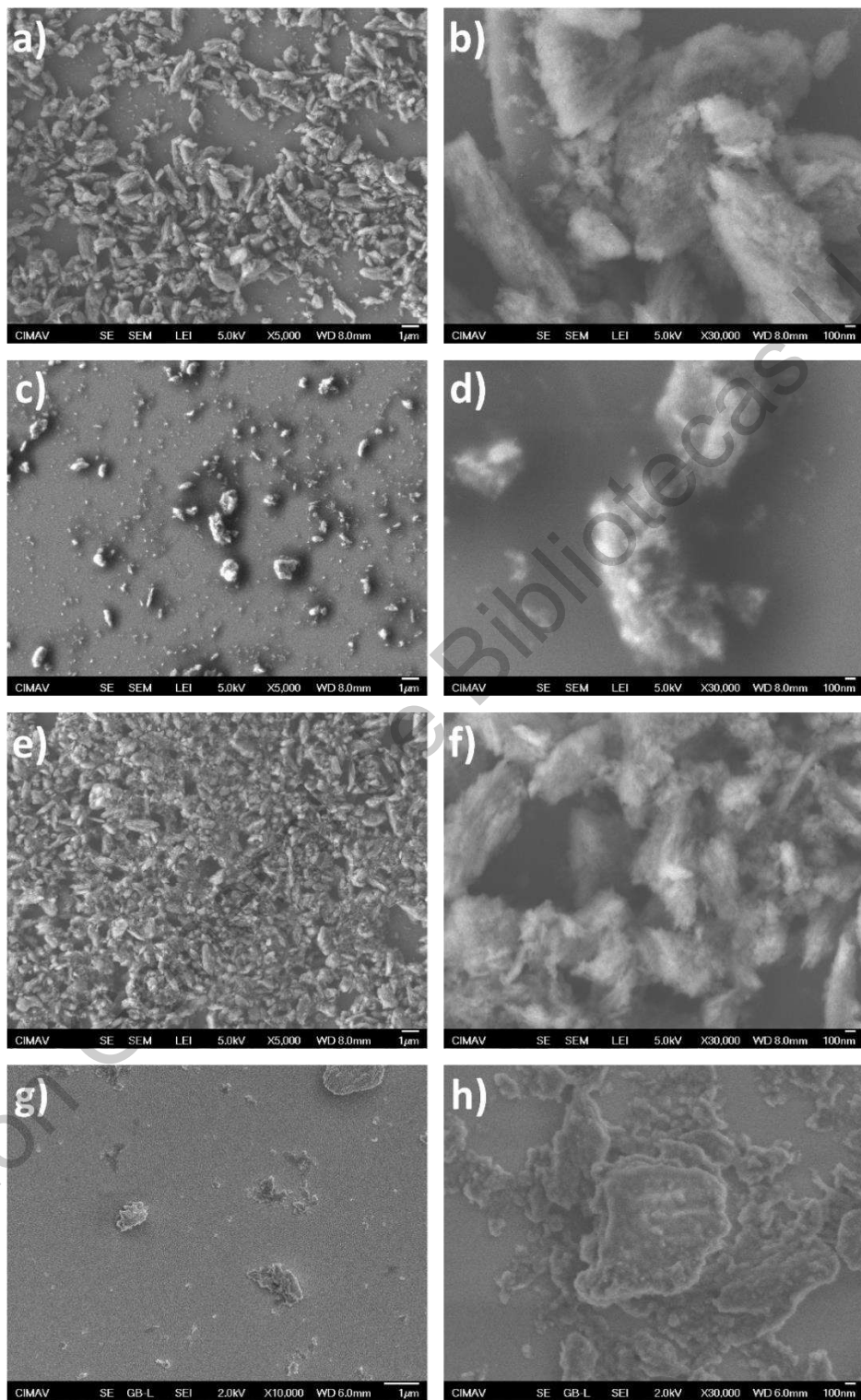
orgánica, esto se debe a que en la muestra B-RAW (*Figura 6.9(a-b)*) se tiene una capa de material orgánico, así como varias capsulas de lípidos adheridas a la superficie. Sin embargo, el ejemplar de la muestra B-KOH (*Figura 6.9(c-d)*) la parte orgánica se ha eliminado parcialmente, dejando apreciar de mejor manera los gránulos de hidroxiapatita. El tener una estructura porosa a la hora de la sonicación puede favorecer a la cavitación, esto se debe a que las burbujas pueden ingresar dentro de los poros con mayor facilidad, dejando una explosión sónica más eficiente para disminuir el tamaño de partícula. Mientras que el contratiempo sería que la limpieza alcalina de KOH puede ser demasiado agresiva y por lo tanto afectar los cristales en su estequiometría química.

A su vez, la *Figura 6.9d* confirma lo mencionado en la sección 6.1, en donde atribuimos el incremento de intensidad de los picos de DRX a la aglomeración y mejor apreciación de los cristales de hidroxiapatita.



**Figura 6.9.** Imágenes SEM (a-b) B-RAW y (c-d) B-KOH.

En la *Figura 6.10* se pueden observar las micrografías de las muestras sonicadas, las cuales fueron obtenidas con electrones secundarios (SE) para tener una mejor información topográfica. De la misma manera, se puede divisar como el proceso de sonicación va degradando las partículas grandes en partículas más pequeñas en función del tiempo de exposición en el sonotrodo, en donde se aprecian partículas grandes y una especie de polvo alrededor de ellas, estas últimas son partículas de menor tamaño. Sin embargo, la existencia de cúmulos de nanopartículas (*Figura 6.10(a-f)*) promueven un pico de difracción más delgado (*Figura 6.3*), corroborando lo mencionado en la sección 6.1 con respecto al análisis de DRX y FWHM, es decir, las partículas están aglomeradas, se pueden apreciar los cristales con mayor facilidad y el ataque generado por el sonotrodo es meramente hacia la materia orgánica reduciendo el tamaño de partícula, manteniendo el tamaño del cristal en forma nanométrica. Por otro lado, en la exposición a 60 min (*Figura 6.10(g-h)*) a pesar de que se observa un aglomerado de nanopartículas de BIO-HAp que evidencia la porosidad generada en el polvo de B-KOH sirve para obtener tamaños de partículas menores como se aprecia en la sección 6.4. A su vez estas últimas presentan la singularidad de tener dimensiones entre valores macrométricos y nanométricos, por lo que se puede catalogar lo obtenido como nanopartículas, ya que al menos poseen una dimensión de entre  $\sim 1 - 100$  nm, redefiniéndolas como nanopartículas de BIO-Hidroxiapatita y asimismo confirmar el motivo por el cual el valor de FWHM a este tiempo de sonicación aumenta.



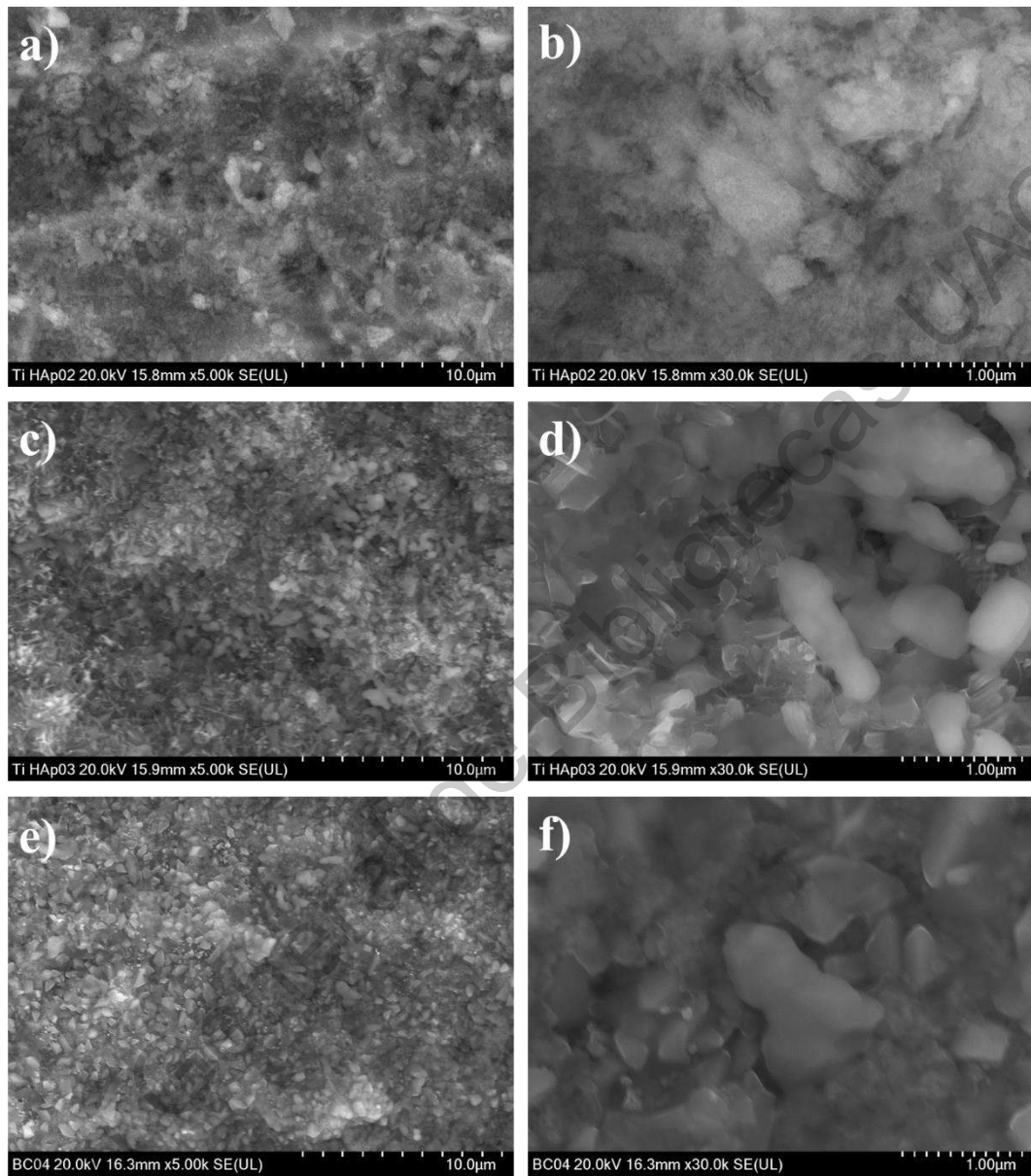
**Figura 6.10.** Imágenes HR-SEM (a-b) B-KOH-10, (c-d) B-KOH-20, (e-f) B-KOH-30 y (g-h) B-KOH-60.



Por último, en la *Figura 6.11* podemos ver las micrografías de alta resolución del compuesto entre el Ti-6Al-4V y las semillas de nano BIO-HAp. Donde se puede apreciar que en la muestra Ti HAp02 (*Figura 6.11(a-b)*), calcinada hasta 500°C, el biocerámico depositado no presenta algún fenómeno de coalescencia; sin embargo, ingresa a lo más profundo del titanio quirúrgico grado 5. Por otro lado, para las muestras en donde se alcanzaron los 720°C, temperatura a la cual coalesce la BIO-HAp, (*Figura 6.11(c-f)*) es posible notar un mejor anclaje, ya que el depósito ingresó hasta la parte más profunda de los surcos; a su vez, existe un mejor recubrimiento, es decir, más homogéneo, debido a la coalescencia del material, esto es debido al aumento en el tamaño del cristal. Sin embargo, la diferencia entre la muestra Ti HAp03 (*Figura 6.11(c-d)*) y Ti HAp04 (*Figura 6.11(e-f)*) es que a esta última al ser su superficie un poco más rugosa y con surcos mejor definidos, el biocerámico encontró más puntos de anclaje.

Asimismo, se observa que cuando el biocerámico fue llevado hasta los 500°C la morfología de sus nanocristales se asemeja a agujas (*Figura 6.11b*); sin embargo, cuando alcanzan los 720°C cambia para ser similares a los de placas finas y delgadas (*Figura 6.11(d, f)*), por lo que se puede concluir que esta última forma crece de manera preferencial hueso y está compuesta por nano agujas, tal cual lo mencionan Londoño-Restrepo, Jeronimo-Cruz, Millán-Malo, Rivera-Muñoz & Rodríguez-García (2019). Este cambio podría deberse a la coalescencia junto con una mejora de calidad cristalina de la BIO-HAp.

A su vez, el incremento de tamaño en los cristales de BIO-HAp que se percibe entre la muestra Ti HAp03 (*Figura 6.11d*) y la Ti HAp04 (*Figura 6.11f*) puede ser a que al ser más rugosa la muestra con 4 barridos y con surcos más definidos los puntos de anclaje sean menos estrechos, esto debido a que si el espacio de anclaje es mayor la cantidad de nano cristales de BIO-Hidroxiapatita aumentara en esa zona; al mismo tiempo, los nano cristales tendrán más libertad de interactuar cuando se incremente la temperatura. Por lo que la coalescencia se desarrollara entre los nanocristales con mayor facilidad, haciendo que sus dimensiones aumenten más en comparación del depósito realizado en el titanio con 3 barridos. Por lo que se genera un recubrimiento más homogéneo.

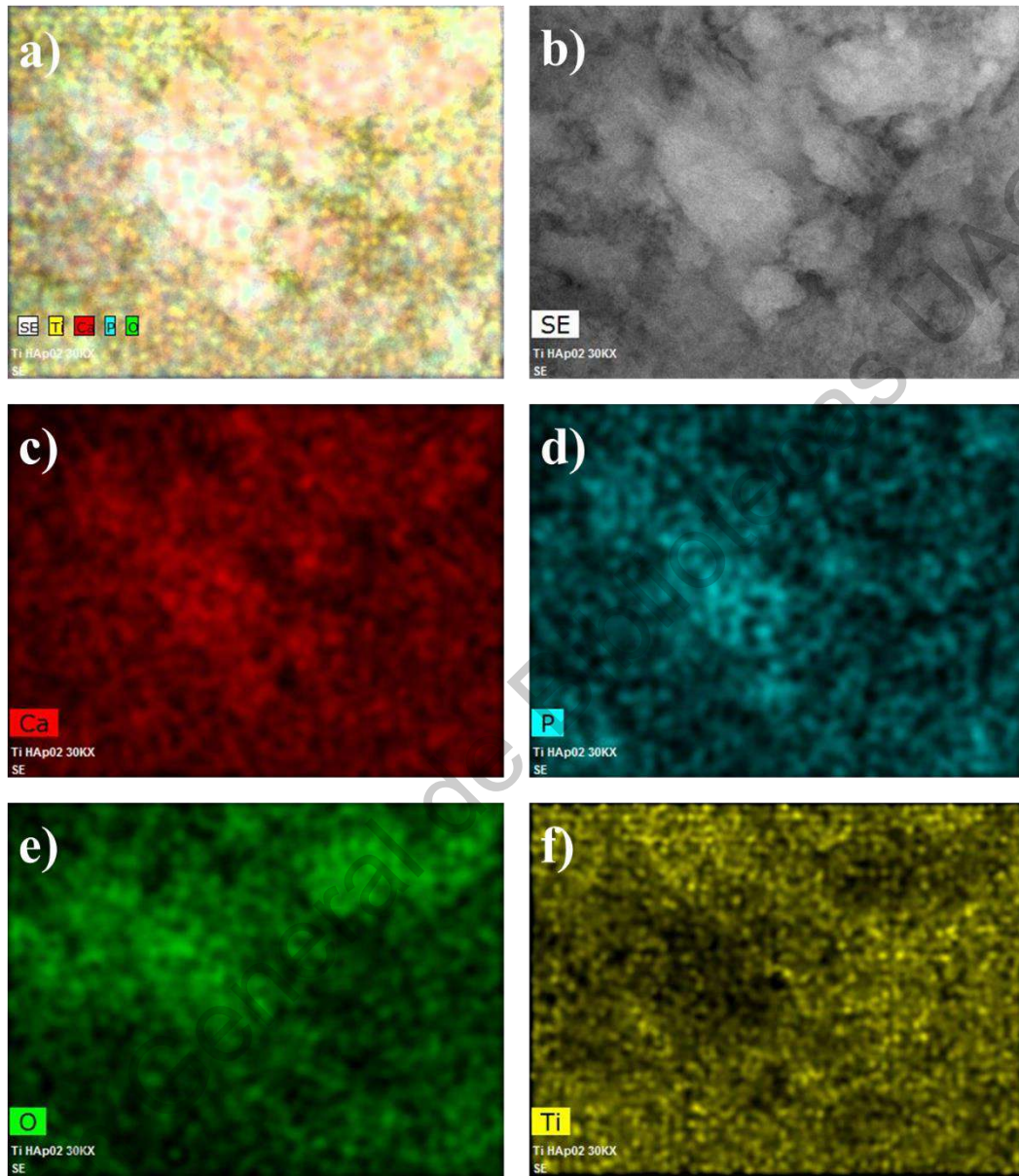


**Figura 6.11.** Imágenes de HR-SEM (a-b) Ti HAp02, muestra calcinada a 500°C, (c-d) Ti HAp03, muestra calcinada a 720°C y (e-f) Ti HAp04, muestra calcinada a 720°C.

### 6.6 Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersiva (EDS)

Para reforzar el análisis de SEM sobre el anclaje de la BIO-HAp en el titanio quirúrgico grado 5 se realizó EDS.

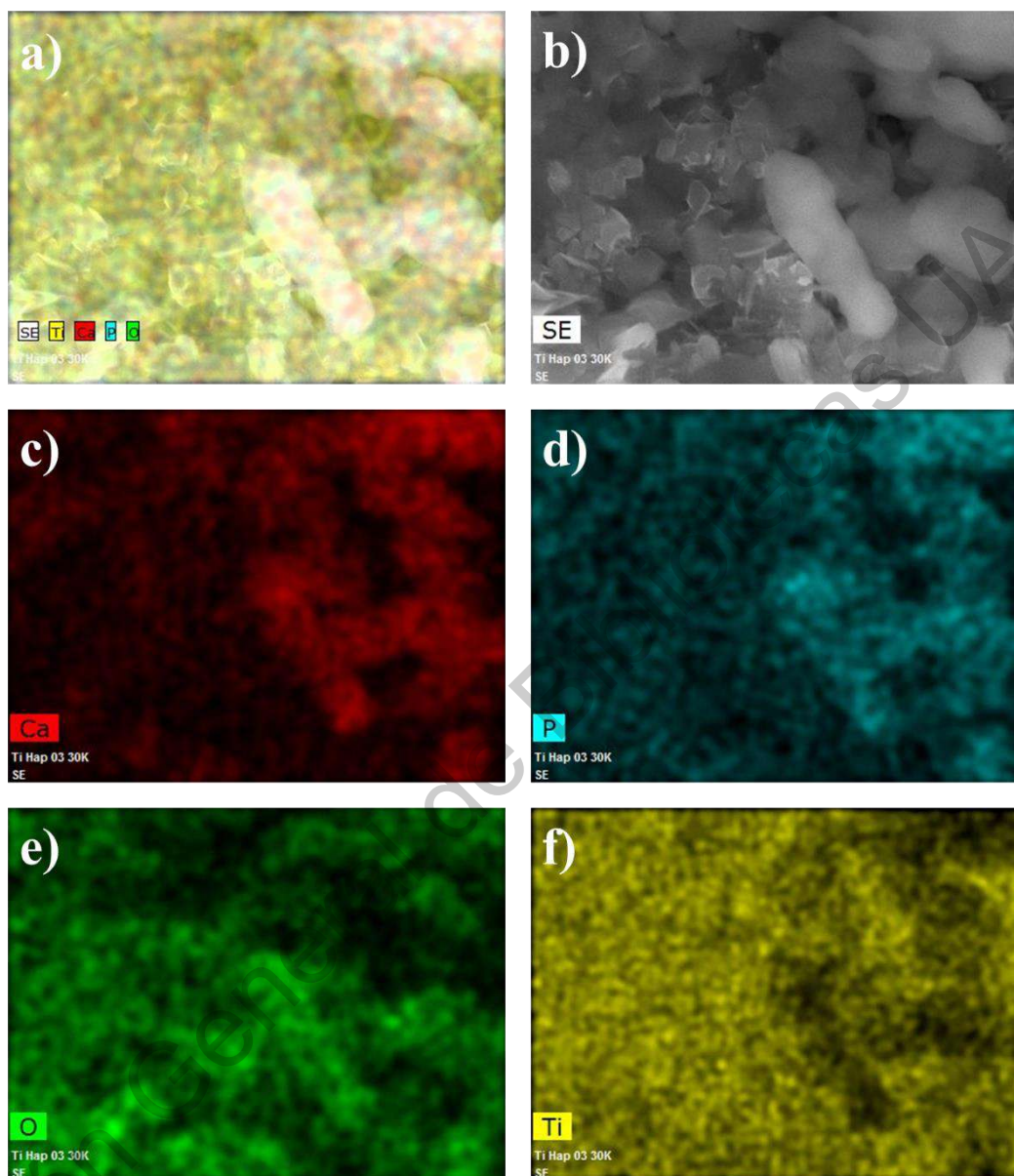
Comenzando, podemos observar en la *Figura 6.12a* que existe una gran concentración de Ti, Ca, P y O en una de las secciones más profundas del compuesto (*Figura 6.13b*). El anclaje que se obtuvo es efectivamente de BIO-HAp, esto se comprueba al observar que el espectro de calcio y fósforo están en el mismo sitio, ya que estos son los que se encuentran con mayor concentración dentro del biocerámico (*Figura 6.12(c-d)*). Por otro lado, el oxígeno (*Figura 6.12e*) se encuentra disperso tanto en las secciones de la BIO-Hidroxiapatita y el titanio (*Figura 6.12f*), es decir, al encontrarse en el primero se refuerza el hecho de la presencia de este material; sin embargo, al encontrarse en el segundo significaría que al momento de realizarse los surcos en una atmósfera no controlada se formó  $\text{TiO}_2$ , demostrando lo dicho en la sección anterior. Asimismo, se observa que el biocerámico está disperso debido a que el material no coalesció (*Figura 6.12f*).



**Figura 6.12.** EDS de la muestra Ti HAp02. (a) Espectro de todos los elementos identificados, (b) imagen de HR-SEM de donde fue tomado el espectro, (c) espectro elemental del calcio, (d) espectro elemental del fósforo, (e) espectro elemental del oxígeno y (f) el espectro elemental del titanio.

Siguiendo con la muestra Ti HAp03, a simple vista se percibe que las placas están conformadas por Ca, P y O, mientras que su alrededor es titanio (*Figura 6.13a*) en una sección profunda del compuesto (*Figura 6.13b*).

Al igual que en la muestra anterior se percibe que el espectro del calcio y fosforo están en los mismos puntos (*Figura 6.13(c-d)*), a su vez que el oxígeno (*Figura 6.13e*) está distribuido tanto en la BIO-HAp como en el Ti (*Figura 6.13f*), por lo que también se puede concluir que existe presencia de  $\text{TiO}_2$ . A pesar de ello, lo más significativo es que el biocerámico ya no está disperso, sino que se encuentra aglomerado en puntos muy específicos y con mayor concentración, esto debido a la formación de placas (*Figura 6.13b*) a causa de la coalescencia, tal cual y se muestra en la *Figura 6.13f*.

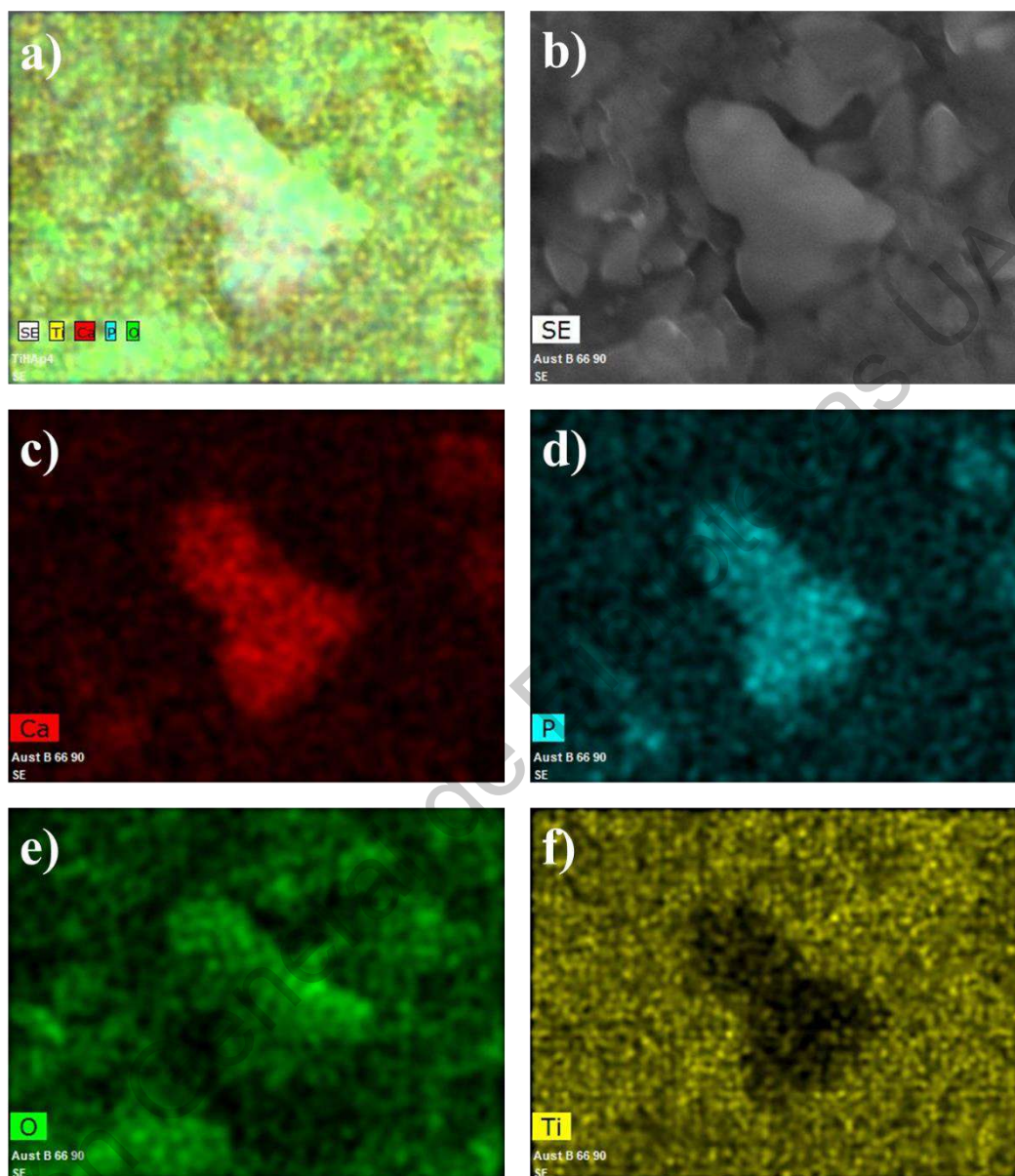


**Figura 6.13.** EDS de la muestra Ti HAp03. (a) Espectro de todos los elementos identificados, (b) imagen de HR-SEM de donde fue tomado el espectro, (c) espectro elemental del calcio, (d) espectro elemental del fosfóro, (e) espectro elemental del oxígeno y (f) el espectro elemental del titanio.

Similar al compuesto Ti HAp03, en la muestra Ti HAp04 se observan con mayor detalle las fronteras entre las placas de BIO-HAp y el titanio, siendo más definidas (*Figura 6.14a*); especialmente en esta sección (*Figura 6.14b*). Por lo tanto, no es de extrañarse que los



espectros de Ca y P coincidan de mejor manera que en las muestras anteriores (*Figura 6.14(c-d)*). De la misma manera, el espectro oxígeno (*Figura 6.14e*) nos ayuda a corroborar que el depósito realmente es de BIO-Hidroxiapatita y que al no tener una atmósfera controlada durante el DLW hizo que se formará dióxido de titanio al estar en el mismo lugar que el espectro de calcio, fósforo y en algunas zonas del Ti (*Figura 6.14f*). Sin embargo, se puede apreciar que en este recubrimiento existe una mejor aglomeración entre los cristales de nano BIO-HAp y por ende menos disperso (*Figura 6.14(b, f)*).



**Figura 6.14.** EDS de la muestra Ti HAp04. (a) Espectro de todos los elementos identificados, (b) imagen de HR-SEM de donde fue tomado el espectro, (c) espectro elemental del calcio, (d) espectro elemental del fosforó, (e) espectro elemental del oxígeno y (f) el espectro elemental del titanio.



## 7 CONCLUSIONES

- El proceso alcalino utilizado en la metodología para limpiar la BIO-Hidroxiapatita por medio de hidróxido de potasio removió parcialmente la materia orgánica propia de la matriz del hueso trabecular de bovino, tal cual y se aprecia en la análisis de espectroscopia infrarroja con atenuación en las bandas relacionadas con las proteínas y grasas.
- Se demostró que la sonicación disminuyó el tamaño de partícula mediante la exposición de 10, 20, 30, 40 y 60 min a 100 W mediante el cálculo de dispersión de luz dinámica con el radio hidrodinámico. A su vez, se demostró que la cavitación degrada el cerámico en nanopartículas conforme al tiempo de exposición hasta el punto en el que se empiezan a aglomerar, tal cual y se muestran en las micrografías.
- Por medio de las microscopías electrónicas de barrido se aprecia como la limpieza alcalina hace poroso al material ayudando al proceso de cavitación.
- Se identificó por medio de la carta del ICDD No. 00-009-0432 la única y principal fase de hidroxiapatita mediante difractogramas, por lo que se demuestra que la BIO-Hidroxiapatita obtenida en este trabajo puede ser utilizada para cirugías e implantes, ya que esta carta es utilizada para identificar hidroxiapatita a fin de ser empleada en estas aplicaciones, tal cual y lo menciona la norma ISO 13779-6:2015.
- Además, por medio del FWHM se demostró como el carácter nanométrico de la BIO-HAp y sus aglomerados de nanocristales que se comportan como un material en bulto afectan a los difractogramas.
- Se corrobora el uso de titanio quirúrgico grado 5 en el compósito por medio de un difractograma, el cual fue identificado con el uso de las cartas ICDD No. 00-044-1288, No. 00-044-1294 y No. 04-020-7055 correspondientes al titanio fase  $\beta$ , titanio fase  $\alpha$  y una aleación entre titanio, aluminio y vanadio respectivamente.
- Se demuestra la creación de porosidad en titanio quirúrgico grado 5 desde el primer barrido realizado con DLW a partir de las microscopías. Sin embargo, la formación de  $TiO_2$  en la base del compósito se debió a que no se tuvo una atmosfera controlada durante el proceso de la técnica.

- Asimismo, la creación de fracturas y corrosión en el Ti-6Al-4V se generan a partir de dos barridos, mientras que los surcos totalmente definidos se forman hasta los 10 barridos, como se muestra en el análisis de HR-SEM.
- El aumento exponencial de la rugosidad que expone la microscopía digital en el titanio quirúrgico de grado 5 es debido a la formación de fracturas y corrosión en el material.
- La deposición en frío de BIO-Hidroxiapatita en titanio quirúrgico fue exitosa, tal cual y se muestran en las micrografías.
- La coalescencia ayuda a un mejor anclaje de los nanocristales de BIO-HAp de manera que se formen placas finas y delgadas compuestas por nano agujas, las cuales crecen de manera preferencial al hueso, como se puede observar en las microscopías electrónicas de barrido.
- Asimismo, la coalescencia de los nanocristales de BIO-HAp ayuda a la formación de un recubrimiento más homogéneo, justo y como se muestra en HR-SEM.
- Gracias al análisis de EDS se concluye que tanto la coalescencia del biocerámico y la rugosidad que tenga la base del compuesto están directamente relacionadas con la calidad del recubrimiento.

## 8 REFERENCIAS

- [1] Andersson, N., Balfour, W. J., Bernath, P. F., Lindgren, B., & Ram, R. S. (2003). Emission spectra of TiH and TiD near 938 nm. *The Journal of chemical physics*, 118(8), 3543-3548. doi: 10.1063/1.1539848
- [2] ASTM, F. (2013). Standard Specification for Wrought Titanium-6Aluminum-4Vanadium ELI (Extra Low Interstitial) Alloy for Surgical Implant Applications (UNS R56401). ASTM F136-13.
- [3] Bahrololoom, M. E., Javidi, M., Javadpour, S., & Ma, J. (2009). Characterisation of natural hydroxyapatite extracted from bovine cortical bone ash. *Journal of Ceramic Processing Research*, 10(2), 129-138. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/283150258\\_Characterisation\\_of\\_natural\\_hydroxyapatite\\_extracted\\_from\\_bovine\\_cortical\\_bone\\_ash](https://www.researchgate.net/publication/283150258_Characterisation_of_natural_hydroxyapatite_extracted_from_bovine_cortical_bone_ash)
- [4] Barakat, N. A., Khil, M. S., Omran, A. M., Sheikh, F. A., & Kim, H. Y. (2009). Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods. *Journal of materials processing technology*, 209(7), 3408-3415. doi: 10.1016/j.jmatprotec.2008.07.040
- [5] Basle, M. F., Mazaud, P., Malkani, K., Chretien, M. F., Moreau, M. F., & Rebel, A. (1988). Isolation of osteoclasts from pagetic bone tissue morphometry and cytochemistry on isolated cells. *Bone*, 9(1), 1-6. doi: 10.1016/8756-3282(88)90020-8
- [6] Bauccio, M. (Edt). (1993). *Metals reference book*. 3era ed. ASM International. Estados Unidos de América: ASM International.
- [7] Berne, B. J., & Pecora, R. (2000). *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Nueva York: Courier Corporation.
- [8] Black, J. (2005), *Biological Performance of Materials: Fundamentals of Biocompatibility*. 4a ed. Boca Raton: Taylor & Francis.
- [9] Braga, F. J., Marques, R. F., de A Filho, E., & Guastaldi, A. C. (2007). Surface modification of Ti dental implants by Nd: YVO4 laser irradiation. *Applied Surface Science*, 253(23), 9203-9208. doi: 10.1016/j.apsusc.2007.05.048

- [10] Bra-nemark, P. I., Zarb, G. A., Albrektsson, T., & Rosen, H. M. (1986). Tissue-integrated prostheses. Osseointegration in clinical dentistry. Recuperado de [https://journals.lww.com/plasreconsurg/citation/1986/03000/tissue\\_integrated\\_prostheses\\_\\_osseointegration\\_in.37.aspx](https://journals.lww.com/plasreconsurg/citation/1986/03000/tissue_integrated_prostheses__osseointegration_in.37.aspx)
- [11] Buser, D. (2001). Titanium for dental applications (II): implants with roughened surfaces. In *Titanium in medicine* (pp. 875-888). Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642
- [12] Camargo, N. H. A., et al., (2009). Synthesis and characterization of nanostructured ceramic powders of calcium phosphate and hydroxyapatite for dental applications. In *Key Engineering Materials*. vol. (396), 619-622. doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.396-398.619
- [13] Camposano, L., & Martínez, N. (2000). Caracterización química y radiométrica de secciones estratigráficas de las formaciones Barco y Mirador, San Pedro del Río, estado Táchira. (Trabajo Especial de Grado, Inédito. Dpto. de Geología, UCV). Recuperado de [http://researchgate.net/publication/49182828\\_Caracterizacion\\_quimica\\_y\\_radiometrica\\_de\\_secciones](http://researchgate.net/publication/49182828_Caracterizacion_quimica_y_radiometrica_de_secciones)
- [14] Carotenuto, G., Spagnuolo, G., Ambrosio, L., & Nicolais, L. (1999). Macroporous hydroxyapatite as alloplastic material for dental applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 10(10-11), 671-676. doi: 10.1023/A:1008952111545
- [15] Chen, X., Zheng, B. & Liu, H. (2011). Optical and Digital Microscopic Imaging Techniques and Applications in Pathology. *Analytical cellular pathology* (Amsterdam). 34. 5-18. doi: 10.3233/ACP-2011-0006.
- [16] Chikazumi, S., & Graham, C. D. (2009). *Physics of Ferromagnetism*. 2e (No. 94). Oxford: Oxford University Press.
- [17] Chu, B. (1970). Laser light scattering. *Annual review of physical chemistry*, 21(1), 145-174. doi: 10.1146 / annurev.pc.21.100170.001045
- [18] COMECARNE. (2019). Compendio estadístico 2019. Recuperado de <https://comecarne.org/compendio-estadistico-2019/>

- [19] Cullity, B. D. (1956). Elements of X-Ray Diffraction. 1era ed. Massachusetts: Addison-Wesley Publishing Company, Inc.
- [20] Da Silva, S. L. R., Kerber, L. O., Amaral, L., & Dos Santos, C. A. (1999). X-ray diffraction measurements of plasma-nitrided Ti-6Al-4V. Surface and Coatings Technology, 116, 342-346. doi: 10.1016/S0257-8972(99)00204-2
- [21] Dean, J. A. (1995). Analytical chemistry handbook (Vol. 1). New York: McGraw-Hill.
- [22] Degirmenbasi, N., Kalyon, D. M., & Birinci, E. (2006). Biocomposites of nanohydroxyapatite with collagen and poly (vinyl alcohol). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 48(1), 42-49. doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.01.002
- [23] Direct Industry. (s.f.). Microscopio de laboratorio DSX510. [Imagen]. Recuperado de <https://www.directindustry.es/prod/olympus/product-17434-866079.html>
- [24] Drake, R., Vogl, A. W., & Mitchell, A. W. (2019). Gray's Anatomy for Students Flash Cards. 4ta ed. China: Elsevier Health Sciences.
- [25] Emsley, J. (2001). Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements. Oxford: Oxford University Press.
- [26] Faeda, R. S., Tavares, H. S., Sartori, R., Guastaldi, A. C., & Marcantonio Jr, E. (2009). Evaluation of titanium implants with surface modification by laser beam: biomechanical study in rabbit tibias. Brazilian oral research, 23(2), 137-143. doi: 10.1590/S1806-83242009000200008
- [27] Ferrari, M., Giannini, I., Sideri, G., & Zanette, E. (1985). Continuous noninvasive monitoring of human brain by near infrared spectroscopy. In Oxygen transport to tissue VII (pp. 873-882). Boston: Springer.
- [28] Filipovic, L., Selberherr, S., Mutinati, G. C., Brunet, E., Steinhauer, S., Köck, A., Teva, J., Kraft, J., Siegert, J. & Schrank, F. (Julio, 2013). Modeling spray pyrolysis deposition. In Proceedings of the world congress on engineering. vol. 2, 987-992. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/880c/a593972e89c24686093c912b3ff70b5a261e.pdf>

- [29] Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed research international*, 2015. doi: 10.1155/2015/421746
- [30] Fraunhofer-Gesellschaft. (Septiembre, 2010). Research News. Recuperado de: [https://www.fraunhofer.de/content/dam/zv/en/documents/rn9\\_SEPTEMBER\\_tcm63-62188.pdf](https://www.fraunhofer.de/content/dam/zv/en/documents/rn9_SEPTEMBER_tcm63-62188.pdf)
- [31] Froes, F., & Qian, M. (Eds.). (2018). *Titanium in Medical and Dental Applications*. Reino Unido: Woodhead Publishing.
- [32] García-Garduño, M. V., & Reyes-Gasga, J. (2006). La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *TIP Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 9(2), 90-95. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=14006>
- [33] Gergely, G., Wéber, F., Lukács, I., Tóth, A. L., Horváth, Z. E., Mihály, J., & Balázs, C. (2010). Preparation and characterization of hydroxyapatite from eggshell. *Ceramics International*, 36(2), 803-806. doi: 10.1016/j.ceramint.2009.09.020
- [34] Giordanino, F., Borfecchia, E., Lomachenko, K. A., Lazzarini, A., Agostini, G., Gallo, E., Soldatov, A.V., Beato, P., Bordiga, S. & Lamberti, C. (2014). Interaction of NH<sub>3</sub> with Cu-SSZ-13 catalyst: a complementary FTIR, XANES, and XES study. *The journal of physical chemistry letters*, 5(9), 1552-1559. doi: 10.1021/jz500241m
- [35] Giraldo-Betancur, A.L., Espinosa-Arbelaez, D.G., del Real-López, A., Millan-Malo, B.M., Rivera-Muñoz, E.M., Gutierrez-Cortez, E., Pineda-Gomez, P., Jimenez-Sandoval, S. & Rodriguez-García, M.E. (2013). Comparison of physicochemical properties of bio and commercial hydroxyapatite. *Current Applied Physics*. 13(7), 1383-1390. doi: 10.1016/j.cap.2013.04.019
- [36] Gómez Ortega, J.L., Elizondo Villareal, N. & Guerrero Villa, H.M. (2004). Visualización cristalográfica de la hidroxiapatita. *Ingenierías*. 7(24), 46-50. Recuperado de <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/10143>
- [37] Goodman, J. W. (1976). Some fundamental properties of speckle. *JOSA*, 66(11), 1145-1150. doi: 10.1364/josa.66.001145

- [38] Gousterova, A., Nustorova, M., Goshev, I., Christov, P., Braikova, D., Tishinov, K., Haertlé, T. & Nedkov, P. (2003). Alkaline hydrolysate of waste sheep wool aimed as fertilizer. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 17(2), 140-145. doi: 10.1080/13102818.2003.10817072
- [39] Groessner-Schreiber, B. & Tuan, R. S. (1992). Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces in vitro. *Journal of cell science*, 101(1), 209-217. Recuperado de <https://jcs.biologists.org/content/joces/101/1/209.full.pdf>
- [40] Guerrero, M., Jazheel, I. & Arroyo-Maya, I. (2018). Técnicas analíticas de caracterización y separación de biomoléculas. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/322275895\\_7\\_Tecnicas\\_analiticas\\_de\\_caracterizacion\\_y\\_separacion\\_de\\_biomoleculas](https://www.researchgate.net/publication/322275895_7_Tecnicas_analiticas_de_caracterizacion_y_separacion_de_biomoleculas)
- [41] Guglielmi, M., Kickelbick, G., & Martucci, A. (Eds.). (2014). *Sol-Gel Nanocomposites* (pp. 1-19). New York: Springer.
- [42] Hammond, C. (2001). *The basics of crystallography and diffraction* (Vol. 214). Oxford: Oxford University Press
- [43] Hawkes, P. W. & Spence, J. C. (Eds.). (2008). *Science of microscopy*. Berlín: Springer Science & Business Media.
- [44] Hernandez-Gil, I. F. T., Gracia, M. A., del Canto Pingarrón, M., & Jerez, L. B. (2006). Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral*, 11, E47-51. Recuperado de <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v11i1/medoralv11i1p47.pdf>
- [45] Hou, C. H., Hou, S. M., Hsueh, Y. S., Lin, J., Wu, H. C., & Lin, F. H. (2009). The in vivo performance of biomagnetic hydroxyapatite nanoparticles in cancer hyperthermia therapy. *Biomaterials*, 30(23-24), 3956-3960. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.020
- [46] Hulbert, S. F., Morrison, S. J., & Klawitter, J. J. (1972). Tissue reaction to three ceramics of porous and non-porous structures. *Journal of biomedical materials research*, 6(5), 347-374. doi: 10.1002/jbm.820060505

- [47] Iijima, M., Du, C., Abbott, C., Doi, Y., & Moradian-Oldak, J. (2006). Control of apatite crystal growth by the co-operative effect of a recombinant porcine amelogenin and fluoride. *European journal of oral sciences*, 114, 304-307. doi: 10.1111/j.1600-0722.2006.00324.x
- [48] INEGI. (2010). Discapacidad. Recuperado de <https://www.inegi.org.mx/temas/discapacidad/>
- [49] INEGI. (31, Marzo, 2015). ESTADÍSTICA DE SACRIFICIO DE GANADO EN RASTROS MUNICIPALES POR ENTIDAD FEDERATIVA 2009-2014. Recuperado de [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2015/especiales/especiales2015\\_03\\_9.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2015/especiales/especiales2015_03_9.pdf).
- [50] Isaacson, B. M., & Jeyapalina, S. (2014). Osseointegration: a review of the fundamentals for assuring cementless skeletal fixation. *Orthopedic Research and reviews*, 6, 55. doi: 10.2147/ORR.S59274
- [51] ISO. (2015). ISO 13779-6:2015 IMPLANTS FOR SURGERY - HYDROXYAPATITE — PART 6: POWDERS. Recuperado de <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:13779:-6:ed-1:v2:en>
- [52] Jenko, M., Gorenšek, M., & Godec, M. (2016). Surface chemistry and microstructure of metallic. *Biomaterials*, 84, 301-314. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.016
- [53] Jeronimo-Cruz, R. (2018). Análisis estructural de BIO-Hidroxiapatita de porcino obtenida mediante incineración controlada. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.
- [54] Karthikeyan, J. (2007). The advantages and disadvantages of the cold spray coating process. In *The cold spray materials deposition process* (pp. 62-71). Woodhead Publishing. doi: 10.1533/9781845693787.1.62
- [55] Kim, K. T., Eo, M. Y., Nguyen, T. T. H., & Kim, S. M. (2019). General review of titanium toxicity. *International journal of implant dentistry*, 5(1), 10. doi: 10.1186/s40729-019-0162-x



- [56] Kim, W., & Saito, F. (2001). Sonochemical synthesis of hydroxyapatite from H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution with Ca (OH)<sub>2</sub>. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 85-88. doi: 10.1016/S1350-4177(00)00034-1
- [57] Kollath, V. O., Chen, Q., Closset, R., Luyten, J., Traina, K., Mullens, S., Boccaccini, A.R. & Cloots, R. (2013). AC vs. DC electrophoretic deposition of hydroxyapatite on titanium. *Journal of the European Ceramic Society*, 33(13-14), 2715-2721. doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2013.04.030
- [58] Laggasé, P. (Edt). (1893). *The Columbia Encyclopedia*. 6ta ed. Columbia: Columbia University Press.
- [59] Lee, J. H., Jang, H. L., Lee, K. M., Baek, H. R., Jin, K., Hong, K. S., Noh, J. H. & Lee, H. K. (2013). In vitro and in vivo evaluation of the bioactivity of hydroxyapatite-coated polyetheretherketone biocomposites created by cold spray technology. *Acta biomaterialia*, 9(4), 6177-6187. doi: 10.1016/j.actbio.2012.11.030
- [60] Lewis, S. L., Hagler, D., Bucher, L., Heitkemper, M. M., Harding, M. M., Kwong, & Roberts, D. (2018). *GUÍA PRÁCTICA DE ENFERMERÍA MÉDICO-QUIRÚRGICA*. 10a ed. Amsterdam: Elsevier
- [61] Londoño-Restrepo, S. M., Herrera-Lara, M., Bernal-Alvarez, L. R., Rivera-Muñoz, E. M., & Rodríguez-García, M. E. (2020). In-situ XRD study of the crystal size transition of hydroxyapatite from swine bone. *Ceramics International*, 46(15), 24454-24461. doi: 10.1016/j.ceramint.2020.06.230
- [62] Londoño-Restrepo, S. M., Jeronimo-Cruz, R., Millán-Malo, B. M., Rivera-Muñoz, E. M., & Rodríguez-García, M. E. (2019). Effect of the nano crystal size on the X-ray diffraction patterns of biogenic hydroxyapatite from human, bovine, and porcine bones. *Scientific reports*, 9(1), 1-12. doi: 10.1038/s41598-019-42269-9
- [63] Londoño-Restrepo, S. M., Jeronimo-Cruz, R., Rubio-Rosas, E. & Rodríguez-García, M. E. (2018). The effect of cyclic heat treatment on the physicochemical properties of bio hydroxyapatite from bovine bone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29(5), 52. doi: 10.1007/s10856-018-6061-5
- [64] Londoño-Restrepo, S. M., Millán-Malo, B. M., del Real-López, A., & Rodríguez-García, M. E. (2019). In situ study of hydroxyapatite from cattle during a controlled

- calcination process using HT-XRD. *Materials Science and Engineering: C*, 105, 110020. doi: 10.1016/j.msec.2019.110020
- [65] Londoño-Restrepo, S. M., Ramirez-Gutierrez, C. F., Villarraga-Gómez, H. & Rodriguez-García, M. E. (2019). Study of microstructural, structural, mechanical, and vibrational properties of defatted trabecular bovine bones: natural sponges. En Holban, Alina-Maria & Grumezescu, A. M. (Eds.), *Materials for Biomedical Engineering: Hydrogels and Polymer-based Scaffolds* (p.p. 444-457). Amsterdam: Elsevier.
- [66] Londoño-Restrepo, S. M., Zubieta-Otero, L. F., Jeronimo-Cruz, R., Mondragon, M. A., & Rodriguez-García, M. E. (2019). Effect of the crystal size on the infrared and Raman spectra of bio hydroxyapatite of human, bovine, and porcine bones. *Journal of Raman Spectroscopy*, 50(8), 1120-1129. doi: 10.1002/jrs.5614
- [67] Londoño-Restrepo, S.M., Ramirez-Gutierrez, C.F., del Real, A., Rubio-Rosas, E & Rodriguez-García, M.E. (2016). Study of bovine hydroxyapatite obtained by calcination at low heating rates and cooled in furnace air. *Journal of Materials Science*. 51(9), 4431–4441. doi: 10.1007/s10853-016-9755-4
- [68] Manton, S. M. & Hamilton, W. J. (2019). Skeleton. *Encyclopedia Britannica*. Recuperado de <https://www.britannica.com/science/skeleton>
- [69] Misch, C. E. (2001). The importance of dental implants. *General Dentistry*, 49(1), 38-45. Recuperado de <https://europepmc.org/article/med/12004675>
- [70] Mombelli, A., & Lang, N. P. (1998). The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontology 2000*, 17(1), 63-76. doi: 10.1111/j.1600-0757.1998.tb00124.x
- [71] Nasiri-Tabrizi, B., Fahami, A., & Ebrahimi-Kahrizangi, R. (2014). A comparative study of hydroxyapatite nanostructures produced under different milling conditions and thermal treatment of bovine bone. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 20(1), 245-258. doi: 10.1016/j.jiec.2013.03.041
- [72] Naylor, W. P., & King, A. H. (1992). *Introduction to metal-ceramic technology* 3era ed. California: Quintessence Publishing Company.
- [73] Olszta, M. J., Cheng, X., Jee, S. S., Kumar, R., Kim, Y., Kaufman, M.J., Douglas, E. P. & Gower, L. B. (2007). Bone structure and formation: A new perspective.

- Materials Science and Engineering: R: Reports, 58(3-5), 77-194. doi: 10.1016/j.msere.2007.05.001
- [74] Pecora, R. D. (1964). Doppler shifts in light scattering from pure liquids and polymer solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 40(6), 1604-1614. doi: 10.1063/1.1725368
- [75] Perednis, D., & Gauckler, L. J. (2005). Thin film deposition using spray pyrolysis. *Journal of electroceramics*, 14(2), 103-111. doi: 10.1007/s10832-005-0870-x
- [76] Pinna, N. (2005). X-Ray diffraction from nanocrystals. In *Scattering Methods and the Properties of Polymer Materials* (pp. 29-32). Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/b107348
- [77] Ramirez-Gutierrez, C. F., Londoño-Restrepo, S. M., Del Real, A., Mondragón, M. A., & Rodríguez-García, M. E. (2017). Effect of the temperature and sintering time on the thermal, structural, morphological, and vibrational properties of hydroxyapatite derived from pig bone. *Ceramics International*, 43(10), 7552-7559. doi: 10.1016/j.ceramint.2017.03.046
- [78] Ramirez-Gutierrez, C. F., Palechor-Ocampo, A. F., Londoño-Restrepo, S. M., Millán-Malo, B. M., & Rodríguez-García, M. E. (2016). Cooling rate effects on thermal, structural, and microstructural properties of bio-hydroxyapatite obtained from bovine bone. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 104(2), 339-344. doi: 10.1002/jbm.b.33401
- [79] Ramos-Guivar, J. (2015). Functionalization of iron oxide magnetic nanomaterials with applications in biosensors and bone tissue regeneration. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de San Marcos, Lima, Peru.
- [80] Robert, A. J. & Charles, L. B. (1991). Berman CL: The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: A 5-year analysis. *J Periodontol*, 62(1), 2-4. doi: 10.1902/jop.1991.62.1.2
- [81] Rosales, M. (s.f.). Tipo de Huesos. [Imagen] Recuperado de <https://www.pinterest.com.mx/pin/87186942770960619/>
- [82] Ross, M. H., & Pawlina, W. (2007). *Histología: Texto y Atlas*. 5ta ed. China: Médica Panamericana.

- [83] Rouhani, P., Taghavinia, N., & Rouhani, S. (2010). Rapid growth of hydroxyapatite nanoparticles using ultrasonic irradiation. *Ultrasonics sonochemistry*, 17(5), 853-856. doi: 10.1016/j.ultsonch.2010.01.010
- [84] Ruiz Bonilla, V. E. (2018). Evaluación de la actividad citotóxica y antioxidante de diferentes nanoemulsiones obtenidas a partir de extractos de Marco (*Ambrosia arborescens*) (Trabajo de tesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica). Recuperado de <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/28379/3/BQ%20159.pdf>
- [85] Sadat-Shojai, M., Atai, M., & Nodehi, A. (2013). U.S. Patent No. 8,357,732. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. Recuperado de <https://patentimages.storage.googleapis.com/48/8a/8c/bf090ce1acd3bd/US8357732.pdf>
- [86] Sánchez Garcés, M., & Gay Escoda, C. (2004). Perimplantitis. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 2004, vol. 9, num. supl., p. 63-74. Recuperado de <http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/50646/1/624977.pdf>
- [87] Sánchez, R. D. (2010). Spray Pirolisis. [Imagen]. Recuperado de <http://www.tandar.cnea.gov.ar/eventos/Nano2010/Rodo%20SanchezPAE.pdf>
- [88] Sandoval-Amador, A., Miranda-Vesga, L. J., Martínez, J. S. P., Peña-Ballesteros, D. Y., & García-Vergara, S. J. (2016). Biofuncionalización de Ti6Al4V mediante crecimiento de nanoestructuras de TiO<sub>2</sub> con contenido de calcio y fósforo. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 21(3), 606-614. doi: 10.1590/S1517-707620160003.0058
- [89] Schminke, B., Vom Orde, F., Gruber, R., Schliephake, H., Bürgers, R., & Miosge, N. (2015). The pathology of bone tissue during peri-implantitis. *Journal of dental research*, 94(2), 354-361. doi: 10.1177/0022034514559128
- [90] Shaltout, A. A., Allam, M. A., & Moharram, M. A. (2011). FTIR spectroscopic, thermal and XRD characterization of hydroxyapatite from new natural sources. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 83(1), 56-60. doi: 10.1016/j.saa.2011.07.036
- [91] Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis*. Boston: Cengage learning.

- [92] Smith, B. C. (1998). *Infrared spectral interpretation: a systematic approach*. Nueva York: CRC press.
- [93] Smith, M. F. (2007). Comparing cold spray with thermal spray coating technologies. In *The cold spray materials deposition process* (pp. 43-61). Woodhead Publishing. doi: 10.1533/9781845693787.1.43
- [94] Suslick, K. S. (1990). Sonochemistry. *science*, 247(4949), 1439-1445. doi: 10.1126/science.247.4949.1439
- [95] Tanaka-Kamioka, K., Kamioka, H., Ris, H., & Lim, S. S. (1998). Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(10), 1555-1568. doi: 10.1359/jbmr.1998.13.10.1555
- [96] Tare, M., Puli, O., Oros, S. & Singh, A. (2009). Drosophila adult eye model to teach Scanning Electron Microscopy in an undergraduate cell biology laboratory. *Population Data Information Service*. 92. 174-180. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/263910532\\_Drosophila\\_adult\\_eye\\_model\\_to\\_teach\\_Scanning\\_Electron\\_Microscopy\\_in\\_an\\_undergraduate\\_cell\\_biology\\_laboratory/citation/download](https://www.researchgate.net/publication/263910532_Drosophila_adult_eye_model_to_teach_Scanning_Electron_Microscopy_in_an_undergraduate_cell_biology_laboratory/citation/download)
- [97] Tavakol, S., Nikpour, M. R., Amani, A., Soltani, M., Rabiee, S. M., Rezayat, S. M., Chen, P. & Jahanshahi, M. (2013). Bone regeneration based on nano-hydroxyapatite and hydroxyapatite/chitosan nanocomposites: an in vitro and in vivo comparative study. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(1), 1-16. doi: 10.1007/s11051-012-1373-8
- [98] Thuault, A., Savary, E., Hornez, J. C., Moreau, G., Descamps, M., Marinel, S., & Leriche, A. (2014). Improvement of the hydroxyapatite mechanical properties by direct microwave sintering in single mode cavity. *Journal of the European Ceramic Society*. 34(7), 1865-1871. doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2013.12.035
- [99] Universidad Nacional Autónoma de México. (2002). Boletín UNAM-DGCS-0288: ECONÓMICOS BIOMATERIALES PARA IMPLANTES ORTOPÉDICOS Y ODONTOLÓGICOS. Recuperado de [https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2002/2002\\_0288ccc.html](https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2002/2002_0288ccc.html)

- [100] Ural, A., & Vashishth, D. (2007). Effects of intracortical porosity on fracture toughness in aging human bone: a  $\mu$ CT-based cohesive finite element study. 129(5), 625-631. doi: 10.1115/1.2768377
- [101] Urbano, M. A. V., Muñoz, Y. H. O., Fernández, Y. O., Mosquera, P., Páez, J. E. R., & Amado, R. J. C. (2011). Nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, fase anatasa, sintetizadas por métodos químicos. *Ingeniería y desarrollo*, 29(2), 186-201. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/inde/v29n2/v29n2a04.pdf>
- [102] Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K. H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M. & Schué, F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*. 84(2), 377-410. doi: 10.1351/PAC-REC-10-12-04
- [103] Welsch, U., & Sobotta, J. (2008). *Histología*. 2da ed. Munich: Médica Panamericana.
- [104] White, T. D., Black, M. T., & Folkens, P. A. (2011). *Human osteology*. Paises Bajos: Elsevier. Academic press.
- [105] Wissmann, M., Schwenke, H., & Neuschaefer-Rube, U. (2006). Speckle correlation method for 3D-deflection measurement of the tactile-optical microprobe. In *Proceedings of the 21st Annual Meeting of the American Society of Precision Engineering* (pp. 79-82). Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/237670974\\_SPECKLE\\_CORRELATION\\_METHOD\\_FOR\\_3D-DEFLECTION\\_MEASUREMENT\\_OF\\_THE\\_TACTILE-OPTICAL\\_MICROPROBE](https://www.researchgate.net/publication/237670974_SPECKLE_CORRELATION_METHOD_FOR_3D-DEFLECTION_MEASUREMENT_OF_THE_TACTILE-OPTICAL_MICROPROBE)
- [106] Woodard, J. R., Hildore, A. J., Lan, S. K., Park, C. J., Morgan, A. W., Eurell, J. A. C., ... & Johnson, A. J. W. (2007). The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials*, 28(1), 45-54. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.08.021
- [107] Wu, Q., Merchant, F., & Castleman, K. (Eds.). (2010). *Microscope image processing*. Amsterdam: Elsevier.
- [108] Yoon, R. H., & Yordan, J. L. (1986). Zeta-potential measurements on microbubbles generated using various surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 113(2), 430-438. doi: 10.1016/0021-9797(86)90178-5

- [109] Young, B., O'Dowd, G., Woodford, P. (2006). Wheater's functional histology: a text and colour atlas. 6a ed. Amsterdam: Elsevier.
- [110] Zabalveytia, F. (s.f.). Esqueleto. [Imagen]. Recuperado de <https://www.pinterest.com.mx/pin/599752875351763381/>
- [111] Zhai, C., Gan, Y., Hanaor, D., Proust, G., & Reiraint, D. (2016). The role of surface structure in normal contact stiffness. *Experimental Mechanics*, 56(3), 359-368. doi: 10.1007/s11340-015-0107-0
- [112] Zubieta, F. (2020). Síntesis y caracterización de nanosistemas híbridos: BIO-Hidroxiapatita / Hidroxiapatita sintética. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México.
- [113] Zwahr, C., Helbig, R., Werner, C., & Lasagni, A. F. (2019). Fabrication of multifunctional titanium surfaces by producing hierarchical surface patterns using laser based ablation methods. *Scientific reports*, 9(1), 1-13. doi: 10.1038/s41598-019-43055-3

## 9.1 Publicación

In-situ XRD study of the crystal size transition of hydroxyapatite from swine bone.  
*ELSEVIER: Ceramics International* (2020) <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.06.230>



### In-situ XRD study of the crystal size transition of hydroxyapatite from swine bone

Sandra M. Londoño-Restrepo<sup>a,\*</sup>, Mariana Herrera-Lara<sup>b</sup>, Leon R. Bernal-Alvarez<sup>b</sup>,  
 Eric M. Rivera-Muñoz<sup>a</sup>, Mario E. Rodríguez-García<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Nanotecnología, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, 76230, Querétaro, Qro, México

<sup>b</sup> Ingeniería Física, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, C.P. 76010, Querétaro, Qro, México

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
 HT-XRD  
 Crystal size transition  
 Coalescence  
 Pore size  
 Swine hydroxyapatite

#### ABSTRACT

Hydroxyapatite was obtained from swine bones (P-HAp) and then, *in situ*, analyzed using differential scanning calorimetry (DSC) and high-temperature X-ray diffraction (HT-XRD). *In situ* X-ray patterns were obtained every 20 °C from 400 to 900 °C, with heating rates: 3, 6, and 9 °C/min. P-HAp was also calcined into a furnace to correlate the morphological properties with *in situ* measures. P-HAp is composed of nanometric like-plates crystals that exhibit high atomic crystalline order that become micrometric after a transition around 720 °C, according to XRD patterns, the DSC thermogram, and electron microscopy images *ex situ* recorded. After that transition, the full width at the half maximum of *in situ* XRD patterns sharply comes down because the inelastic scattering contribution decreases. In the case of nanocrystals, the pore size and surface area are governed by the intra-crystal spacing, while for microcrystals, they are governed by the inter-crystal spacing.

#### 1. Introduction

Hydroxyapatite (HAp) is a ceramic material widely used in several research fields such as biology [1], medicine [2], dentistry [3], chromatography [4], catalysis [5], among others. Nowadays, the demand of HAp for clinical applications has increased around the world because medical advances must be adjusted to the requirements of the population. In this way, it is possible to extract large amounts of HAp with properties like human HAp by harnessing bio-waste by-products such as cattle and swine bones produced by human feed habits [6–10]. HAp exhibits a stoichiometric chemical composition of  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , while, in the case of hydroxyapatite from bones (BIO-HAp), its chemical composition varies since it contains traces of ions such as  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Si}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$ , and  $\text{CO}_3^{2-}$ , among others [11]. The presence of these ions plays an important role during angiogenesis and osteogenesis, which is the process of new blood vessel formation and bone growth and regeneration, respectively [12].

BIO-HAp can be used as a biomaterial after meticulous cleaning processes to remove the organic matrix. These cleaning processes usually involve calcination at elevated temperatures. Porcine bone is continuously used due to its similarity to the human bone, regarding its macro and microstructure, chemical composition, and remodeling rate.

Therefore, this makes it an abundant source at a relatively low cost of bone grafts [13]. O'Brien [14] established some requirements for bone grafts such as bioactivity, biocompatibility, biodegradability, osteoinductivity, osteoconductivity, enough mechanical properties, and a suitable architecture that allow a better link with the surrounding host tissue. However, there is still a lack of knowledge about the physicochemical transformations that take place in BIO-HAp from bones during the calcination process. It is well known that the tissue-biomaterial response depends directly on the physicochemical properties of the biomaterial; thus, they must be controlled on the design and fabrication steps.

Calcination of bones to obtain BIO-HAp free of organic compounds involves multiple thermal variables that cause physicochemical changes such as heating rate, sintering time and temperature, and cooling rate [9]. Heating processes can induce structural and morphological changes as crystal growth, porosity loss, crystalline quality enhancing, surface area reduction, the formation of additional crystalline phases, degradation of hydroxyapatite, among others. For this reason, the behavior of the BIO-HAp is worth studying systematically during calcination.

So far, there are few works aimed at understanding the structural and morphological changes of porcine BIO-HAp as a function of the

\* Corresponding author.  
 E-mail address: [smile2508@comunidad.unam.mx](mailto:smile2508@comunidad.unam.mx) (S.M. Londoño-Restrepo).

<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.06.230>  
 Received 4 May 2020; Received in revised form 17 June 2020; Accepted 20 June 2020  
 Available online 22 June 2020  
 0272-8842/ © 2020 Elsevier Ltd and Techna Group S.r.l. All rights reserved.