



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Ingeniería Física

**PROCESAMIENTO DE HUESO TRABECULAR BOVINO
PARA LA EVALUACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS
EN FUNCIÓN DE LA POSICIÓN Y COMPOSICIÓN**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

INGENIERA FÍSICA

Presenta:

Mariana Herrera Lara

Dirigido por:

Dr. Mario Enrique Rodríguez García

Co-dirigido por:

Dra. Sandra Milena Londoño Restrepo

Santiago de Querétaro, Querétaro. México



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Ingeniería Física

**PROCESAMIENTO DE HUESO TRABECULAR BOVINO PARA LA
EVALUACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS EN FUNCIÓN DE LA
POSICIÓN Y COMPOSICIÓN**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
INGENIERA FÍSICA

Presenta:

Mariana Herrera Lara

Dirigido por:

Dr. Mario Enrique Rodríguez García

Co-dirigido por:

Dra. Sandra Milena Londoño Restrepo

SINODALES

Dr. Mario Enrique Rodríguez García

Presidente

Firma

Dra. Sandra Milena Londoño Restrepo

Secretaría

Firma

Dra. Margarita Contreras Padilla

Vocal

Firma

Dr. Cristian Felipe Ramírez Gutiérrez

Sinodal

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro. México.
Mayo 2021

Dirección General de Bibliotecas UAQ

A mi familia, por siempre apoyarme y creer en mí.

*Las ideas científicas iluminan los
rincones oscuros.*

- Jill Tarter, Astrónoma

Agradecimientos

A mis asesores de tesis, por mostrarme lo importante e interesante que es la investigación así como dedicar tiempo para transmitir sus conocimientos y ser partícipes de mi formación como profesionista.

Al Dr. Mario Enrique Rodríguez García por permitirme formar parte del Laboratorio de Biocerámicos y de su equipo de trabajo desde que inicié la carrera, así como de brindarme diversas oportunidades para desarrollarme como Ingeniera Física.

A la Dra. Sandra Milena Londoño Restrepo, por ser un ejemplo a seguir como mujer en la ciencia, trabajadora y dedicada a lo que apasiona.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, mis profesores y mi coordinadora de carrera la Dra. María Lucero Gómez Herrera, por educarme y formarme como una Ingeniera íntegra para así aportar a la sociedad queretana.

Al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por permitirme el acceso y uso de instalaciones de primer nivel para el desarrollo de la presente tesis así como el apoyo del personal académico que ahí labora.

Al programa PAPIIT (IN114320) de la UNAM, el estímulo de Ayudante de Investigador SNI III y el proyecto de la convocatoria SEP-CONACYT Ciencia Básica (8979) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por dar los recursos económicos para la elaboración de este trabajo.

Agradecimientos personales

Gracias a mi mamá, que es un ejemplo de una mujer fuerte e inteligente, que lucha por sus objetivos para salir adelante. Por fomentar mi curiosidad por explorar la naturaleza, demostrarme que soy capaz de lograr todo lo que me proponga, por no frenar mis deseos de dedicarme a la ciencia e interesarse en los temas de los que le platico aunque no los entienda del todo.

Gracias a mi abuelita Maripaz, por enseñarme a no dejarme callar, a ser activa, independiente y a apoyar a los demás. Por escucharme y comprenderme.

A mi abuela Malena, por sus muestras infinitas de amor y cariño, sus abrazos que sanan el alma, por recordarme siempre lo mucho que valgo y lo hermosa que soy simplemente por ser yo.

A mi hermana, por debarir conmigo, compartir sus conocimientos y ser mi cómplice de aventuras.

A mi papá, por incentivarne a siempre dar la mejor versión de mí.

A mi abuelito Isauro, por siempre estar dispuesto a apoyarme, ser amable, respetuoso, considerado y atento así como un ejemplo a seguir que con esfuerzo y dedicación se logra todo lo que uno se propone.

A mi abuelo Alberto, un hombre inteligente, trabajador y responsable que da todo por su familia.

A mis tíos, por ser mis mejores amigos de la infancia y celebrar mis logros aún a la distancia.

A mis amigos, por formar parte importante de mi vida, acompañarme en el camino y compartir muchas experiencias inolvidables.

Resumen

El hueso trabecular de origen animal tiene un amplio campo de aplicación como biomaterial en las áreas de medicina, odontología y ciencia de materiales debido principalmente a sus propiedades de biocompatibilidad, osteointegración y regeneración ósea.

El objetivo de este trabajo fue determinar los cambios morfológicos y mecánicos de cabezas femorales de hueso trabecular bovino en función de la posición, dirección y composición con y sin fase orgánica, para conocer su influencia en las propiedades del tejido óseo. Se presentan los análisis realizados a muestras cúbicas extraídas de diferentes posiciones de la cabeza femoral las cuales fueron tratadas con procesos hidrotérmicos a $154\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 1.2 atm , así como de calcinación a $580\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una velocidad de calentamiento de $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ por 60 h .

En *SEM* se observó que existen diferentes tamaños de poro y morfologías, los cuales influyen en una buena distribución de sangre, colágeno y otros nutrientes que contribuyen a la regeneración ósea.

Los resultados del *FWHM* para el pico (002) a partir de *XRD* fueron utilizados para obtener el tamaño del cristal de HAp en las direcciones X, Y y Z. El corrimiento hacia la izquierda de los picos de difracción es un indicador de un aumento en el tamaño de la red cristalina debido a las aportaciones de iones de calcio, sodio y magnesio. Debido a las intensidades del pico (002) se concluye que el hueso tiene una dirección preferencial de crecimiento en la dirección Z.

Las pruebas mecánicas indican la dependencia de la resistencia mecánica de los andamios a las contribuciones de la fase orgánica e inorgánica del hueso, así como de los cambios al variar la posición y dirección de análisis. A menor cantidad de fase orgánica, menor resistencia a la compresión. Los cubos que se encuentran a las orillas de la cabeza tienen mayor resistencia así como los que se comprimieron en la dirección Z por lo cual se afirma que el hueso es anisotrópico, se encuentra precargado y tiene una dirección preferencial de crecimiento en Z.

Abstract

The objective of this work was to determine the morphological and mechanical changes of femoral heads of bovine trabecular bone as a function of the position, direction and composition with and without organic phase, to know their influence on the properties of bone tissue.

The analyzes performed on cubic samples taken from different positions of the femoral head are presented, which were treated with hydrothermal processes at $154\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 1.2 atm , as well as calcination at $580\text{ }^{\circ}\text{C}$ with a heating rate of $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ por 60 h .

In *SEM* it was observed that there are different pore sizes and morphologies, which influence a good distribution of blood, collagen and other nutrients that contribute to bone regeneration.

The *FWHM* results for the (002) peak from *XRD* were used to obtain the crystal size of HAp in the X, Y and Z directions. The shift to the left of the diffraction peaks is an indicator of an increase in the size of the crystal lattice due to the contributions of calcium, sodium and magnesium ions. Due to the intensities of the peak (002) it is concluded that the bone has a preferential growth direction in the Z direction.

The mechanical tests indicate the dependence of the mechanical resistance of the scaffolds on the contributions of the organic and inorganic phase of the bone, as well as on the changes when varying the position and direction of analysis. The lower the amount of organic phase, the lower the resistance to compression. The cubes that are on the edges of the head have greater resistance as well as those that were compressed in the Z direction, for which it is stated that the bone is anisotropic, is preloaded and has a preferential growth direction in Z.

Índice general

Agradecimientos	III
Resumen	V
Abstract	VI
Índice	VII
Índice de figuras	IX
Índice de tablas	XI
1. Introducción	1
1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Justificación	2
1.3. Hipótesis	3
1.4. Objetivo general	3
1.4.1. Objetivos específicos	3
2. Marco Teórico	4
2.1. Tejido óseo	4
2.1.1. Hueso cortical	6
2.1.2. Hueso trabecular	7
2.1.3. Hidroxiapatita	8
2.1.4. Porosidad	8
2.2. Técnicas de caracterización	9
2.2.1. Microscopía electrónica de barrido	9
2.2.2. Difracción de rayos X	12
2.2.3. Propiedades mecánicas: ensayo de compresión	18
3. Metodología	23
3.1. Obtención de muestras	24
3.1.1. Dependencia de la posición	26

3.1.2. Dependencia de la composición y dirección	27
3.2. Tratamientos térmicos	27
3.2.1. Hidrotérmico	27
3.2.2. Calcinación	28
3.3. Caracterización fisicoquímica	29
3.3.1. Microscopía electrónica de barrido	29
3.3.2. Difracción de rayos X	30
3.3.3. Propiedades mecánicas	31
4. Resultados y discusiones	33
4.1. Microscopía electrónica de barrido	33
4.2. Difracción de rayos X	35
4.3. Propiedades mecánicas	38
4.3.1. Dependencia de la posición	39
4.3.2. Dependencia de la composición y dirección	42
5. Conclusiones	45
Referencias	49
Apéndice A. Producción científica	50
A.1. Artículos en línea	50

Índice de figuras

2.1.	A) Estructura jerárquica del hueso. B) Estructura de un hueso largo [12] . . .	6
2.2.	Diagrama esquemático de un <i>SEM</i> [20].	10
2.3.	Diagrama de señales generadas en un <i>SEM</i> [22].	11
2.4.	Diagrama esquemático del sistema de un difractor [26].	13
2.5.	Diagrama de la difracción de un haz en un material cristalino, Ley de Bragg [27].	13
2.6.	Patrón de difracción de rayos X característica del sulfato de cobre ($CuSO_4$). Fuente: elaboración propia.	15
2.7.	Representación gráfica del ancho a altura media de un pico de difracción [32].	17
2.8.	Esquema de la tensión producida en la celda unidad, donde se indican dos valores extremos de los desplazamientos de la red d : (a) $d + \Delta d$ y (b) $d - \Delta d$ [30].	17
2.9.	Diagrama de los componentes de una máquina universal de ensayos [34]. . .	19
2.10.	Geometrías básicas del modo de deformación de compresión [35].	20
2.11.	Diagrama esfuerzo-deformación. Fuente: elaboración propia.	22
3.1.	Diagrama de bloque para obtener y caracterizar las muestras del hueso. a) Perfil térmico del proceso de calcinación. Fuente: elaboración propia.	24
3.2.	Mini sierra circular Chicago Electric. Fuente: CFATA-UNAM.	25
3.3.	Diagrama de las posiciones de las muestras cúbicas. Fuente: elaboración propia.	26
3.4.	Corte de muestras cúbicas de hueso trabecular bovino. Fuente: elaboración propia.	26
3.5.	Autoclave All American 1916x. Fuente: CFATA-UNAM	27
3.6.	Proceso hidrotérmico. Fuente: CFATA-UNAM.	28
3.7.	Mufla Felisa modelo FE-361. Fuente: CFATA-UNAM.	29
3.8.	Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6060. Fuente: CFATA-UNAM.	30
3.9.	Difractor de rayos X Rigaku Ultima IV. Fuente: CFATA-UNAM.	31
3.10.	Máquina universal Zwick / Roell Z005. Fuente: CFATA-UNAM.	32
3.11.	Ensayo de compresión en máquina universal. Fuente: elaboración propia. . .	32
4.1.	Micrografías <i>SEM</i> de la microarquitectura del hueso trabecular bovino con ampliaciones de $15 \times$, $50 \times$ y $100 \times$. Fuente: elaboración propia.	34

4.2. Patrones <i>XRD</i> para cada lado de un cubo de muestra. Fuente: elaboración propia.	36
4.3. Valores del <i>FWHM</i> para el pico de difracción (002). Fuente: elaboración propia.	37
4.4. A) Tamaño de cristal para los picos de difracción con mayor intensidad en las direcciones X, Y y Z. B) Promedio del tamaño del cristal en cada dirección. Fuente: elaboración propia.	38
4.5. Diagrama de esfuerzo-deformación y módulo de Young para las muestras de A) y B) primer nivel, C) y D) segundo nivel, E) y F) del tercer nivel del cubo de hueso trabecular bovino, respectivamente. Fuente: elaboración propia.	40
4.6. Ubicación de la cabeza femoral. Fuente: elaboración propia.	41
4.7. Diagrama de esfuerzo-deformación y módulo de Young para las muestras de A) y B) hueso crudo, C) y D) con proceso hidrotérmico, E) y F) con proceso hidrotérmico + calcinación en las direcciones X, Y y Z, respectivamente. Fuente: elaboración propia.	43

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Índice de tablas

4.1. Promedio del tamaño de poros en micrografías SEM.	34
--	----

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Introducción

Los andamios o trabéculas naturales de hueso bovino se utilizan ampliamente en medicina y odontología, ya que brindan soporte mecánico durante la reparación y guían la regeneración ósea. El injerto óseo ocupa el segundo lugar en la lista de tejidos más comunes para trasplante, por lo que existe la necesidad de encontrar un material que reemplace a los autoinjertos y aloinjertos debido a que en el primero existe morbilidad del sitio donante y problemas de disponibilidad del injerto; y en el caso de los aloinjertos no hay suficientes donantes para cubrir la demanda de tejido óseo. Por otro lado, este tipo de injerto presenta riesgo de transmisión de enfermedades.

1.1. Planteamiento del problema

Una alternativa al uso de prótesis metálicas es la creación de andamios con base en materiales naturales como la biohidroxiapatita (BIO-HAp) o, en su defecto, el recubrimiento de las prótesis metálicas con biocerámicos para disminuir las afectaciones que producen los óxidos metálicos al cuerpo humano. En el caso de los andamios, éstos deberían ser capaces de soportar cargas pesadas y a la vez permitir la osteoconductividad, por lo cual, diversos grupos de investigación han hecho estudios enfocados en tecnologías de hueso, en los que se ha intentado realizar una impresión tridimensional pero se obtienen fuertes estructuras óseas basadas en andamios primarios que son compatibles estructuralmente pero inertes funcionalmente o, estructuras frágiles y suaves con propiedades osteoconductoras pero extremadamente débiles en su estructura [1].

Para poder crear estos andamios es de vital importancia conocer el funcionamiento mecánico de los huesos humanos para así poder replicar sus propiedades por lo cual, en la literatura existen artículos en los que se reportan investigaciones sobre propiedades mecánicas de hueso cortical humano como el de [2], quienes realizaron pruebas en fémures proximales de donadores, entre los 46 y los 99 años (19 hombres y 20 mujeres) sin enfermedades óseas y que fallecieron por causas naturales, dependientes de la edad, género, composición y micro-

indentación. Su estudio mostró que el contenido mineral o los parámetros morfológicos no fueron significativamente diferentes entre las muestras de ambos sexos, pero se observa una tendencia positiva en cuanto a la relación entre la porosidad y la edad del donador.

La propuesta de andamios basados en BIO-HAp o prótesis metálicas recubiertas con bio-cerámicos surge del hecho de que se han generado diversas afectaciones locales y sistemáticas en pacientes con implantes de reemplazo de articulaciones usualmente manufacturados de aleaciones de cobalto-cromo o de titanio (Ti). Un ejemplo de ello es que después de que el dispositivo es implantado se genera corrosión, haciendo que iones y partículas de metal sean liberadas al tejido local y a la sangre. Particularmente, el Ti es un metal ampliamente utilizado en la producción de muchos dispositivos médicos como prótesis. A éste se le reconocen diversas propiedades fisicoquímicas que han sido aprovechadas en el área médica como resistencia a la corrosión y biocompatibilidad, pero estudios [3, 4] sugieren que estos implantes muestran desgaste y corrosión en ambientes fisiológicos, liberando subproductos pro-inflamatorios en el tejido circundante ya que el Ti es altamente insoluble y no se puede desechar en la orina, sino que se acumula gradualmente en órganos distales lo que puede llevar a lesiones tisulares.

Swiatkowska et al. [5], mencionan que el mecanismo exacto de liberación de Ti de los implantes, la identidad de la especie liberada (partículas frente a iones) y su destino celular no está claro.

Debido a los hechos mencionados con anterioridad, el diseño y obtención de materiales con las propiedades mecánicas apropiadas para el uso médico representa un gran desafío para la ingeniería de tejidos debido a que ha sido reportado que la arquitectura de los andamios debe ser una red interconectada con alta porosidad y un tamaño medio de poro, además deberán existir cristales nanométricos de hidroxiapatita (HAp) para proveer de una amplia superficie para reaccionar con el tejido huésped, entre otras características.

Existe una ventaja en el uso de andamios naturales de hueso trabecular, ya que es un desecho que puede ser utilizado para aplicaciones médicas si se realizan los tratamientos adecuados para garantizar que este material sea inerte [6].

1.2. Justificación

Existe un auge en los últimos años de materiales bio-compatibles para su posible uso en aplicaciones biomédicas. La estructura de materiales biogénicos provenientes de mamíferos (humanos, bovinos y porcinos) ha sido estudiada por difracción de rayos X (*XRD*), ya que éstos están formados por nanocristales de HAP, así como trazas menores de otros elementos como magnesio (Mg), sodio (Na), etc. La presencia de estos iones en los cerámicos de origen biológico son de gran importancia en aplicaciones de ingeniería de tejidos debido a su influencia en las propiedades estructurales, térmicas, ópticas y morfológicas de la HAp. Se

han explorado diversos métodos de separación de la fase mineral y la matriz orgánica como procesos hidrotérmicos ácidos o alcalinos así como calcinación. Hasta el momento, se han realizado estudios variando diversas condiciones en los procesos hidrotérmicos y de calcinación como son la tasa de calentamiento, temperatura de cocido, tiempo de sinterización, así como tiempo y atmósfera de enfriamiento; lo que da como resultado propiedades fisicoquímicas diferentes [7].

Derivado de esto se plantea la posibilidad de, a través del aprovechamiento de residuos orgánicos, extraer HAp de origen totalmente biológico. Sin embargo, debido al problema anteriormente planteado, se ve la necesidad de conocer primero las propiedades mecánicas del hueso natural proveniente de bovinos en función de la posición y composición, para posteriormente mejorar los patrones de impresión tridimensional de prótesis con materiales biocerámicos.

1.3. Hipótesis

Las propiedades mecánicas, estructurales y morfológicas del hueso trabecular bovino dependen de la posición y dirección en la que se encuentra la muestra extraída de la cabeza femoral (epífisis), así como de su composición antes y después de tratamientos con temperatura.

1.4. Objetivo general

Determinar los cambios morfológicos y mecánicos de cabezas femorales de hueso trabecular bovino en función de la posición, dirección y composición con y sin fase orgánica, para conocer su influencia en las propiedades del tejido óseo.

1.4.1. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de esta tesis son:

- Analizar los cambios morfológicos en las muestras seleccionadas por medio de microscopía electrónica de barrido (*SEM*), para conocer la influencia de la dirección de extracción del hueso en la estructura de la cabeza femoral.
- Analizar los cambios estructurales en las muestras seleccionadas utilizando (*XRD*), para conocer la influencia de la dirección de extracción del hueso en la estructura de la cabeza femoral.
- Medir las propiedades mecánicas de muestras cúbicas extraídas de cabezas femorales por medio de pruebas de compresión en una máquina universal de ensayos para conocer la dirección en la cual tiene mayor resistencia así como la influencia de su composición y posición de extracción.

Marco Teórico

2.1. Tejido óseo

El hueso se forma a partir de cartílago mineralizado en la etapa embrionaria. Después de la hinchazón de los condrocitos, la matriz del cartílago en los rudimentos óseos se mineraliza. Es solo después de esa etapa que los osteoclastos (células de reabsorción ósea) y los osteoblastos (células formadoras de hueso) invaden y comienzan un proceso de modelado para construir la estructura ósea [8].

El hueso es un tejido vivo compuesto de una fase orgánica (20-30 % m/m), una fase inorgánica (60-70 % m/m) y alrededor de un 10 % m/m de agua. La fase orgánica se compone principalmente de colágeno, pero también existen pequeñas concentraciones de lípidos y proteínas no colágenas, lo que le provee elasticidad, flexibilidad y resistencia. Por otro lado, la fase inorgánica está compuesta en su mayoría por hidroxiapatita [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] aunque existen iones como magnesio, flúor (F) y sodio que forma la mayoría de los componentes de la matriz inorgánica, para proveer de rigidez mecánica y resistencia de carga al hueso [9, 10].

Londoño-Restrepo et al. [6] mencionan que ambas fases aportan fuerza y resistencia al hueso, ya que así, el esqueleto puede absorber el impacto sin romperse y proveer de un punto de soporte para los músculos.

Los huesos deben ser rígidos para tolerar la deformación, pero flexibles para absorber energía; así como capaces de deformarse sin agrietarse, acortarse y ensancharse en compresión y alargarse y estrecharse en tensión. De igual manera, deben ser ligeros para permitir un movimiento rápido. El cambio permanente en su forma está asociado con microrrupturas que permiten la liberación de energía, una defensa contra la fractura total. Si la zona plástica y elástica es excedida, el hueso se fractura. Por lo tanto, el hueso tiene su fuerza al cumplir con propiedades contradictorias: rigidez y flexibilidad, ligereza y resistencia, por su composición material y diseño estructural.

Los huesos más grandes tienen una densidad mineral ósea volumétrica aparentemente más baja que los huesos más pequeños. El desplazamiento adicional de la corteza ligeramente más delgada confiere una mayor resistencia a la flexión porque la resistencia a la flexión es proporcional a la cuarta potencia del radio. En huesos largos, se favorece la rigidez sobre la flexibilidad. La rigidez y flexibilidad del tejido óseo varía dependiendo de la concentración de contenido mineral [11].

Los huesos del esqueleto proveen de un soporte estructural para el resto del cuerpo, movimiento y anclaje para los músculos, protección vital para los órganos y estructuras internas, albergan células hematopoyéticas y mantienen la homeostásis mineral. Sirven como reserva de los factores de crecimiento y proporcionan el ambiente para la hematopoyesis dentro de los espacios medulares.

Dentro del esqueleto humano existen cuatro categorías generales de huesos:

- Largos: clavículas, cúbitos, falanges, fémures, fibulas, húmero, metacarpianos, metatarsianos, tibias y radios.
- Cortos: carpo, rótula, sesamoideos, tarso.
- Planos: costillas, cráneo, escápula, esternón y mandíbula.
- Irregulares: coxis, hioides, sacro y vértebras.

Es de gran importancia comprender la relación estructural entre los diferentes niveles de la organización jerárquica estructural para entender la función de la HAp dentro del hueso [12]:

1. Macroestructura: hueso cortical vs trabecular.
2. Microestructura y sub-microestructura: sistema de Havers, osteonas y lamelas.
3. Nanoestructura: colágeno fibrilar.
4. Sub-nanoestructura: constituyentes moleculares de los minerales, colágeno y proteínas orgánicas no colágenas.

En la Figura 2.1 se puede observar gráficamente la estructura organización a diferentes escalas así como sus componentes en cada una de ellas.

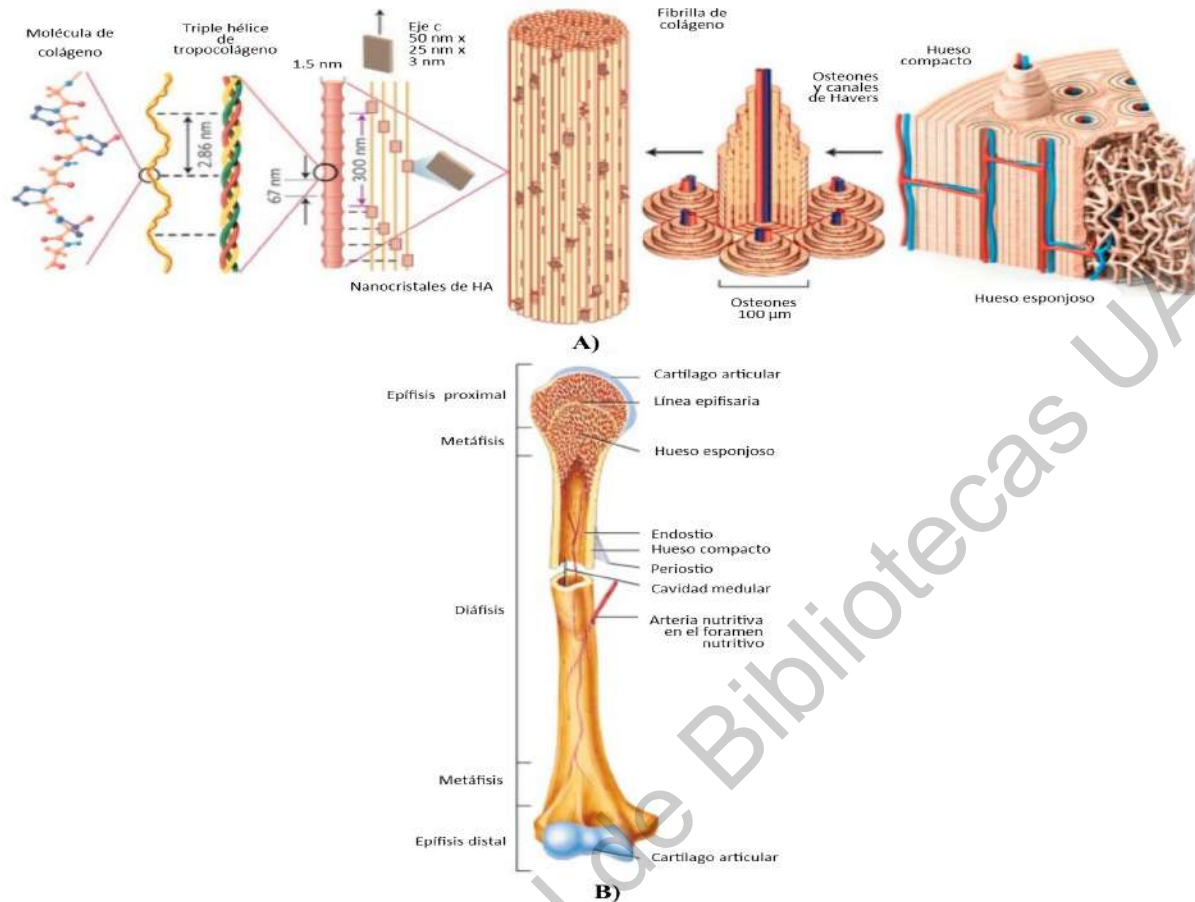


Figura 2.1: A) Estructura jerárquica del hueso. B) Estructura de un hueso largo [12]

El esqueleto humano de un adulto está compuesto en un 80 % de hueso cortical y el 20 % restante de hueso trabecular, la cual es la forma en la que éste se clasifica a nivel macroscópico. La relación entre ellos depende del hueso y el sitio esquelético. Ambos tipos de hueso están compuestos de osteonas las cuales son la unidad estructural básica del tejido óseo, estos huesos normalmente se forman con un patrón laminar en los cuales las fibrillas de colágeno se colocan en orientaciones alternas dotando de fuerza significativa [10].

2.1.1. Hueso cortical

El hueso cortical o compacto es un tejido mineralizado denso y sólido que conforma la capa externa de la mayoría de los huesos, rodea al espacio medular y al hueso trabecular el cual se encuentra en la diáfisis de los huesos largos; por lo regular es menos activo metabólicamente que el hueso trabecular y su porosidad es usualmente <5%. Puede alcanzar un grosor de entre varias décimas de milímetro (en la vértebra) hasta varios milímetros o incluso centímetros en la mitad del eje de los huesos largos [2, 10, 12].

La superficie externa de este tipo de hueso es el periostio, su actividad es de gran importancia para el crecimiento por aposición y la reparación de fracturas. Es un tejido conectivo que contiene vasos sanguíneos, fibras nerviosas, osteoblastos y osteoclastos, está firmemente unido a la superficie cortical externa del hueso mediante fibras de colágeno gruesas, llamadas fibras de Sharpeys, que se extienden hasta el tejido óseo subyacente. Se le llama endostio a la superficie interna del hueso cortical con $\sim 5 m^2$ de área total en donde se lleva a cabo una mayor actividad de remodelado que en el periostio. Las osteonas corticales son llamadas sistema de Havers y tienen una forma cilíndrica con aproximadamente 400 *mm* de largo, 200 *mm* de ancho en su base y sus paredes están formadas por lamelas concéntricas; este sistema de Havers forma una red con diferentes ramificaciones a lo largo del hueso cortical [10].

2.1.2. Hueso trabecular

El hueso trabecular o esponjoso, es un material complejo y poroso que se encuentra en la epífisis y metáfisis de todos los huesos largos y entre los huesos planos e irregulares. Sus propiedades elásticas y de resistencia varían dependiendo de los sitios anatómicos, las enfermedades y la edad. A escala macroestructural, la retícula ósea trabecular dura, compuesta de columnas y placas trabeculares, forma una estructura rígida y dúctil que proporciona el marco para la médula ósea suave y altamente celular que llena los espacios intertrabeculares. A escala microestructural, la arquitectura trabecular típicamente está orientada de manera que hay una dirección de “grano” a lo largo de la cual la rigidez mecánica y la resistencia son mayores pero se observa una arquitectura heterogénea, lo que conduce a amplias variaciones en las propiedades mecánicas. El contenido y la arquitectura de minerales y colágeno determinan las propiedades mecánicas del tejido óseo trabecular [13, 14].

Las trabéculas microestructurales que forman el hueso esponjoso están compuestas de material de tejido trabecular, éstas encierran un espacio poroso abierto, tridimensional e interconectado que da como resultado un material de tipo sólido celular. Los poros se llenan con médula espinal y células vivas. La escala de los poros es del orden de micrones a milímetros, y la escala del grosor trabecular es un orden de magnitud menor [14]. Las trabéculas tienen un hábito de crecimiento preferencial en forma de laminillas con aproximadamente 20 μm de diámetro [6].

La direccionalidad microestructural provee al hueso esponjoso de propiedades mecánicas anisotrópicas. El material del tejido está dispuesto en “paquetes” de hueso laminar, por lo tanto, este se clasifica desde la perspectiva de la ingeniería de materiales como un sólido celular poroso abierto, anisotrópico y compuesto el cual muestra un comportamiento dependiente del tiempo, así como susceptibilidad al daño durante la carga cíclica. Este tipo de hueso es el principal soporte de carga en los cuerpos vertebrales y transfiere la carga de las articulaciones al hueso compacto de la corteza de los huesos largos [13, 14].

En 1892 el cirujano alemán Julius Wolff descubrió que la arquitectura trabecular del fémur se alinea con la dirección del esfuerzo principal, además Roux propuso una ley de “máximo-mínimo” en la que el hueso esponjoso se regenera para alcanzar su máxima resistencia con una cantidad mínima de material, y ambas leyes mencionadas con anterioridad son altamente aplicables al fémur y las vértebras pero no a huesos faciales como la mandíbula [15].

2.1.3. Hidroxiapatita

La hidroxiapatita es una forma de apatita, el fosfato de calcio más abundante en la tierra así como el más estable termodinámicamente al estar sometido a las condiciones de pH, temperatura y composición de los fluidos fisiológicos. Se encuentra en los huesos de los vertebrados, dentina, esmalte dental, en rocas ígneas, sedimentarias y metamórficas por igual. [16, 17, 18].

La HAp tiene una estructura hexagonal, con relación molar estequiométrica de Ca/P de 1.67 la cual exhibe bioactividad y biocompatibilidad excepcional, dimensiones de celda $a = b = 9.42 \text{ \AA}$ y $c = 6.88 \text{ \AA}$ y grupo espacial $P6_3/m$ lo que quiere decir que tiene un eje de simetría séxtuple con una hélice triple y un microplano [17].

La HAp actúa como el único componente mineral del hueso, tiene una gran afinidad para hospedar tejidos duros. Esta puede ser sintética pero a pesar de las similitudes químicas, el rendimiento mecánico de la hidroxiapatita sintética es muy pobre en comparación al hueso [17].

Los cristales de HAp ósea miden aproximadamente 200 \AA en su dimensión más larga. Estos cristales pequeños, pobremente cristalinos, sustituidos con carbonato les permite apoyar el metabolismo mineral. Conforme el hueso madura, los cristales de HAp crecen y reducen su nivel de impurezas. Las vesículas extracelulares de la matriz contienen un núcleo nucleacional que se compone de proteínas y un complejo de fosfolípidos ácidos, calcio y fosfato inorgánico que es suficiente para precipitar los cristales de HAp.[10].

2.1.4. Porosidad

La porosidad puede definirse como la relación entre un volumen acumulativo de intersticios o huecos en un material y el volumen total. La porosidad y el tamaño del poro se correlacionan con la irrigación sanguínea y la presencia de vasos a través de hueso nuevo creado a partir de injertos de osteoblastos [6].

El tamaño del poro en el hueso se puede dividir en tres grupos [19]:

1. **Porosidad primaria - macroporosidad:** también llamada porosidad vascular (*VP*), es donde se encuentra el tamaño de poro más grande y esta consiste en el volumen de todos los túneles en el hueso que contienen vasos sanguíneos e incluye los canales que se percolan a través del hueso, osteonales primarios y secundarios (longitudinales) así

como los canales de Volkmann (transversales).

Para el caso del hueso trabecular, los canales de Havers tienen un rango de porosidad entre el 4.1 % – 25.5 %, así como un tamaño del diámetro del poro de 27.1 μm a los 77.5 μm .

2. **Porosidad secundaria - microporosidad:** se le conoce también como porosidad lacunar-canalicular (*LCP*), está asociada a las lagunas de osteocitos y los canales de canalículos. Tiene un rango de porosidad del 1.3 % – 3 %, el tamaño del diámetro del poro va de los 3.07 μm a los 4.45 μm .
3. **Porosidad terciaria - nanoporosidad:** es donde se encuentra el tamaño de poro más pequeño, también se le llama porosidad colágeno-apatita (*CAP*) y en ésta los poros se encuentran espaciados entre el colágeno y los nanocristales de la HAp. A través de los canales, los osteocitos intercambian nutrientes y desechos.

Mientras que la osteogénesis se beneficia de la microporosidad, que proporciona una gran área superficial que permite que los osteoblastos se adhieran, la macroporosidad mejora el crecimiento óseo.

2.2. Técnicas de caracterización

2.2.1. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (*SEM*) por sus siglas en inglés, es utilizada para examinar y analizar la morfología, estructuras cristalinas, defectos y/o fenómenos físicos como la coalescencia intracristalina, la composición química elemental por espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (*EDS*) de alguna muestra [20].

Cuando la muestra es irradiada con un haz de electrones fino, también conocido como sonda de electrones, electrones secundarios son emitidos de la superficie de la muestra. La topografía de la superficie puede ser observada por una sonda de escaneo bidimensional y la adquisición de una imagen proveniente de los electrones secundarios detectados [20].

La Figura 2.2 muestra el diagrama de un *SEM* marca JEOL, donde se observa que el *SEM* requiere un sistema óptico de electrones, un escenario motorizado para colocar las muestras, un detector de electrones secundarios para recolectar electrones secundarios, una unidad de visualización de imágenes y un sistema operativo para realizar varias operaciones.

El sistema óptico de electrones consta de un cañón de electrones (compuesto por un ánodo, un cátodo y un cilindro Wehnel), una lente condensadora y una lente de objetivo para producir el haz de electrones, una bobina de barrido para explorar la sonda de electrones y otros componentes. Este sistema óptico de electrones (dentro de la columna del microscopio) y el espacio que rodea la muestra se mantienen al vacío gracias al uso combinado de bombas

de vacío y alto vacío para que los electrones del haz viajen del cátodo a la muestra con poca interacción con las moléculas del gas residual [20, 21].

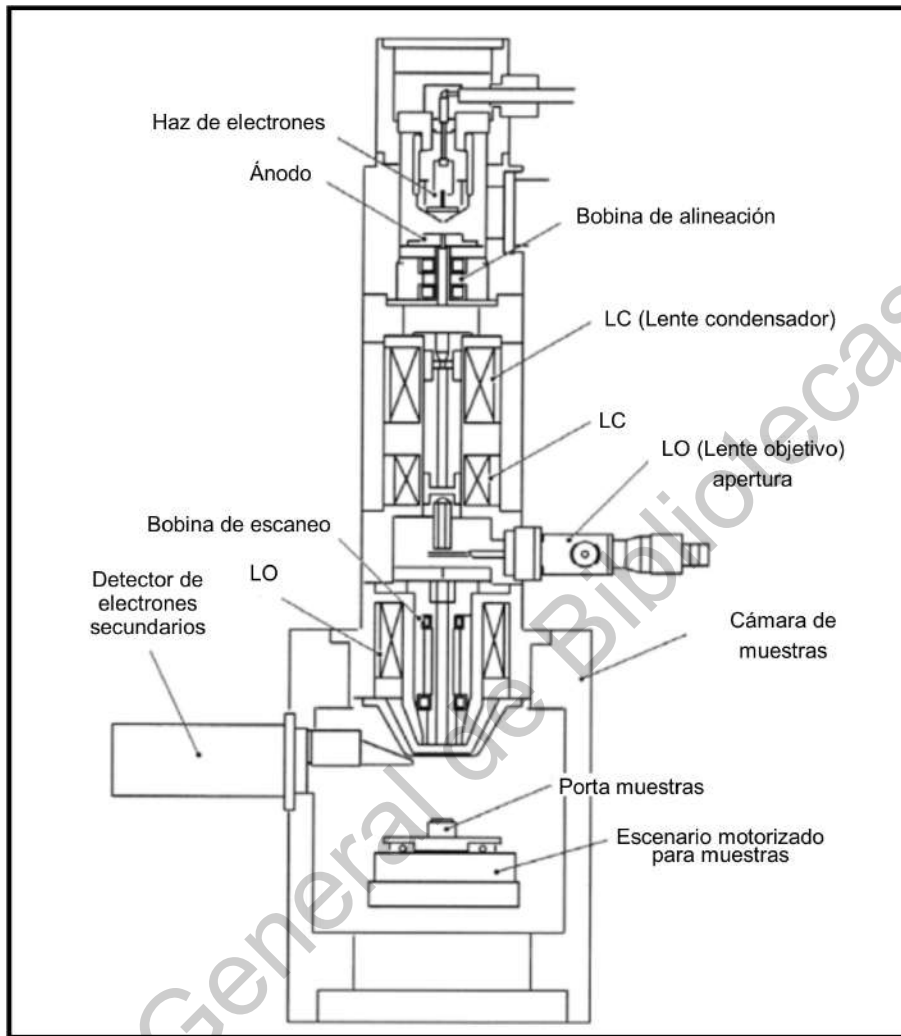


Figura 2.2: Diagrama esquemático de un SEM [20].

Cuando el haz de electrones interactúa con la muestra se generan diversas señales, las cuales se ilustran en la Figura 2.3. Para fines de este estudio sólo se considerarán tres: electrones retrodispersados, electrones secundarios y emisión de rayos X [22].

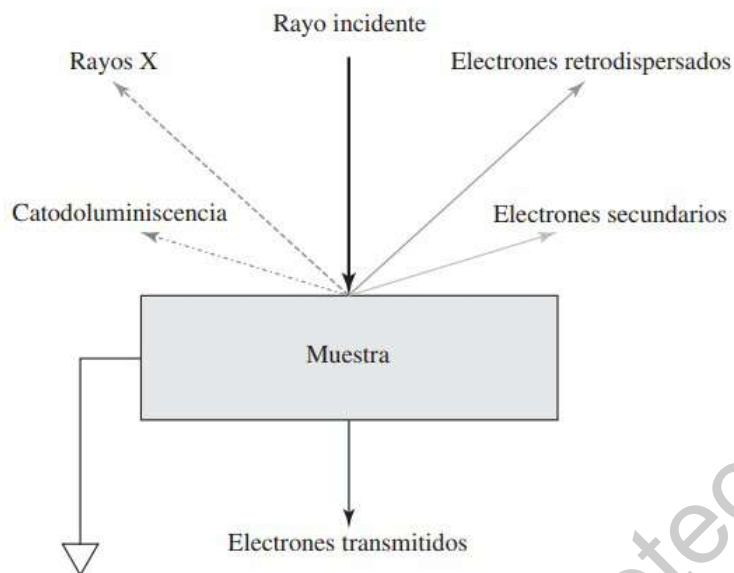


Figura 2.3: Diagrama de señales generadas en un *SEM* [22].

La formación de imágenes en *SEM* depende de las señales adquiridas producidas por el haz de electrones y las interacciones con la muestra. Estas interacciones del haz de electrones con la muestra pueden ser inelásticas o elásticas [23]:

- **Dispersión elástica:** resulta de la deflexión del electrón incidente por el núcleo atómico de la muestra o por electrones de la capa exterior de energía similar. Esta interacción se caracteriza por una pérdida de energía insignificante durante la colisión y por un cambio direccional de gran ángulo del electrón disperso. Los electrones incidentes que se dispersan elásticamente a través de un ángulo de más de 90° se denominan electrones retrodispersados (*BSE*) y producen una señal útil para obtener imágenes de la muestra.
- **Dispersión inelástica:** ocurre a través de interacciones entre los electrones incidentes y los electrones y átomos de la muestra, dando como resultado que el electrón del haz primario transfiera energía sustancial a ese átomo. La cantidad de energía que se pierde depende de si los electrones de la muestra son excitados individual o colectivamente, así como de la energía de enlace entre el electrón y el átomo. Como resultado, la excitación de los electrones de la muestra durante la ionización de los átomos de la misma conduce a la generación de electrones secundarios (*SE*) los cuales pueden ser utilizados para obtener imágenes o analizar principalmente la textura y rugosidad de la superficie de la muestra ya que tienen bajas energías y solo pueden escapar de una región dentro de unos pocos nanómetros de la superficie del material. Entonces, los electrones secundarios marcan con precisión la posición del haz y brindan información topográfica con buena resolución. Una señal de un electrón secundario puede resolver estructuras superficiales del orden de 10 nm o mejor. Aunque podría producirse un

número equivalente de electrones secundarios como resultado de la interacción del haz primario de la muestra, solo aquellos que puedan alcanzar el detector contribuirán a la imagen final.

Para detectar los electrones secundarios, un centelleador convierte la energía de los electrones en fotones. Luego, los fotones producidos viajan por un tubo de luz y se mueven a través de la pared de la cámara de muestras y hacia un tubo fotomultiplicador (*PMT*) que convierte la energía cuántica de los fotones nuevamente en electrones. El voltaje de salida del *PMT* se amplifica aún más antes de emitirse como modulación de brillo en la pantalla de visualización del *SEM* [23].

2.2.2. Difracción de rayos X

La difracción de rayos X *XRD* es una técnica no destructiva para caracterizar materiales amorfos, cristalinos, policristalinos, entre otros; que provee información de la estructura, fase, orientación cristalina preferencial y otros parámetros estructurales como el tamaño de grano, cristalinidad, esfuerzo y defectos cristalinos [24].

Los sólidos cristalinos consisten en arreglos periódicos de átomos, iones y moléculas con espaciamiento interatómico del orden de 100 *pm* o 1Å. La longitud de onda de la luz incidente debe ser del mismo orden que el espaciamiento entre los átomos y los centros de dispersión deben estar distribuidos en el espacio de forma periódica. La difracción de rayos X sólo ocurre cuando estas condiciones de interferencia constructiva se cumplen [25].

En la Figura 2.4 se puede observar el diagrama de un difractómetro en el cual, los rayos X se generan a partir de una fuente de electrones (tubo de rayos catódicos) donde se filtran para producir radiación monocromática (haz incidente o primario), un medio para acelerar electrones a altas velocidades, un material que funja como blanco para recibir el impacto de los electrones e interactuar con ellos y un goniómetro para mantener el ángulo y rotar la muestra.

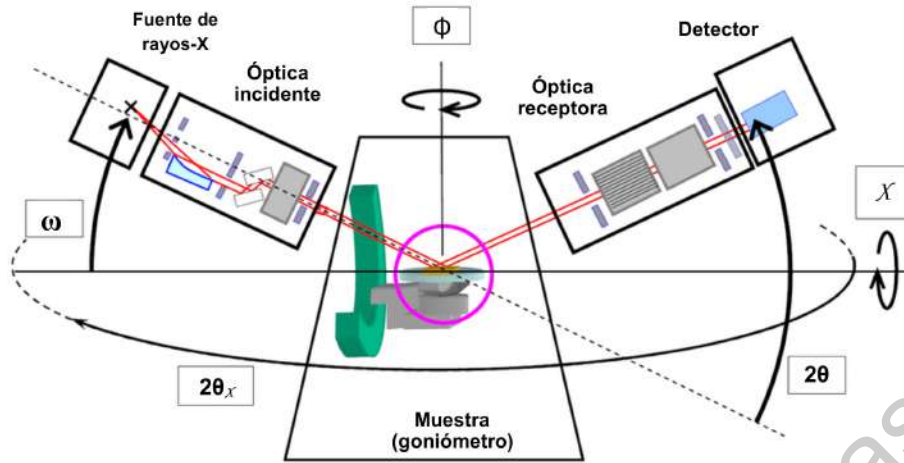


Figura 2.4: Diagrama esquemático del sistema de un difractómetro [26].

La interacción entre los rayos incidentes y la muestra da como resultado interferencia constructiva (y un haz difractado) cuando las condiciones satisfacen la ley de Bragg, vista de forma gráfica en la Figura 2.5 y enunciada en la ecuación 2.1. Esta ley relaciona la longitud de onda de radiación electromagnética con el ángulo de difracción y el espaciado de la red en una muestra cristalina, en este caso un haz angosto de radiación choca contra la superficie del cristal a un ángulo θ y la difusión tiene lugar como consecuencia de la interacción de la radiación con los átomos [22].

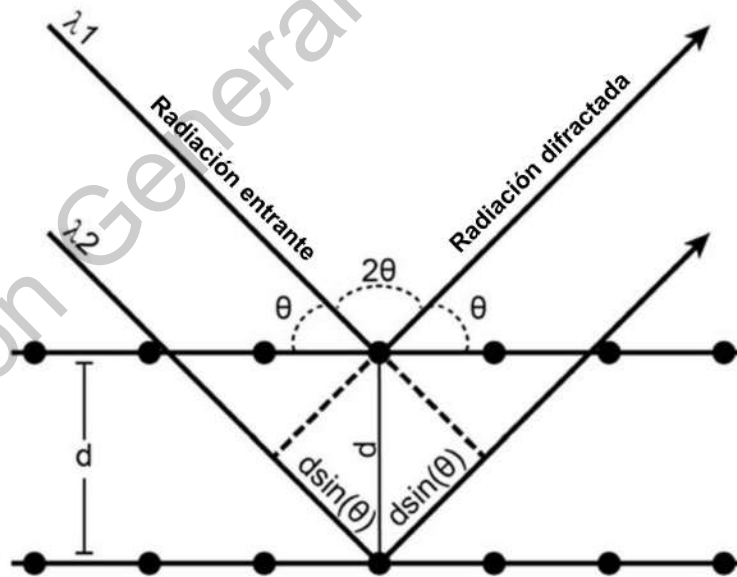


Figura 2.5: Diagrama de la difracción de un haz en un material cristalino, Ley de Bragg [27].

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad (2.1)$$

donde n es un entero, λ es la longitud de onda de los rayos X, d_{hkl} es la distancia interplanar que genera la difracción, y θ es el ángulo de difracción. De la condición de la Ley de Bragg, también conocida como ecuación de dispersión, se pueden calcular las distancias interplanares del material cristalino, dando como resultado la ecuación 2.2:

$$d_{hkl} = \frac{n\lambda}{2 \sin \theta} \quad (2.2)$$

Estos rayos X difractados son detectados, procesados y contados. La muestra se escanea a través de un rango 2θ , todas las posibles direcciones de difracción de la red deben lograrse debido a la orientación aleatoria del material en polvo. La conversión de los picos de difracción en espaciamentos d_{hkl} permite la identificación del compuesto porque cada compuesto tiene un conjunto de espaciamentos d_{hkl} únicos los cuales dependen únicamente de la geometría de la celda unitaria del cristal, mientras que las intensidades de los rayos X difractados dependen del tipo de átomos en el cristal y la ubicación de los átomos en la unidad repetitiva fundamental, la celda unitaria [24, 28].

Los electrones producidos en el cátodo, dentro del tubo de rayos catódicos, se aceleran hacia el ánodo metálico (blanco) mediante una diferencia de potencial de hasta 100 kV ; cuando los electrones chocan con el blanco, parte de la energía del haz se convierte en rayos X y se emite en todas direcciones, generando un espectro continuo de longitudes de onda. Sin embargo, cuando los electrones que son acelerados en el tubo de rayos X alcanzan una cierta energía crítica y son capaces de arrancar electrones más internos de los átomos que componen el blanco, provocarán que los átomos se encuentren en un estado supremamente excitado y eventualmente, los átomos regresarán a su estado de equilibrio emitiendo un conjunto de fotones de alta frecuencia, produciendo así el espectro característico del blanco utilizado [22].

Los resultados de ésta técnica se presentan en un difractograma de rayos X el cual se considera como la huella digital de arreglos atómicos periódicos en un material dado y se obtiene mediante un barrido automático de la muestra. La base de datos estándar para el patrón de *XRD* se utiliza para la identificación de fases para una gran variedad de fases cristalinas en diferentes muestras, la identificación de un compuesto desconocido se basa en la posición de las líneas (picos de difracción en términos de θ o 2θ), y en sus intensidades relativas. El ángulo de difracción 2θ se determina por la separación entre un grupo particular de planos; con la ayuda de la ecuación de Bragg, la distancia d se calcula a partir de una longitud de onda conocida de la fuente y del ángulo medido. Las intensidades de la línea dependen del número y del tipo de centros atómicos de reflexión que existen en cada grupo de planos. La identificación de los cristales se hace de manera empírica, comparando los espacios entre planos del patrón de polvo de una muestra con los compuestos en el archivo de difracción de polvos (*PDF*) por sus siglas en inglés, del Centro Internacional para Datos de Difracción (*ICDD*) en Newtown Square, Pennsylvania [22, 24].

Un ejemplo de lo anterior se puede observar en el patrón de difracción presentado en la Figura 2.6.

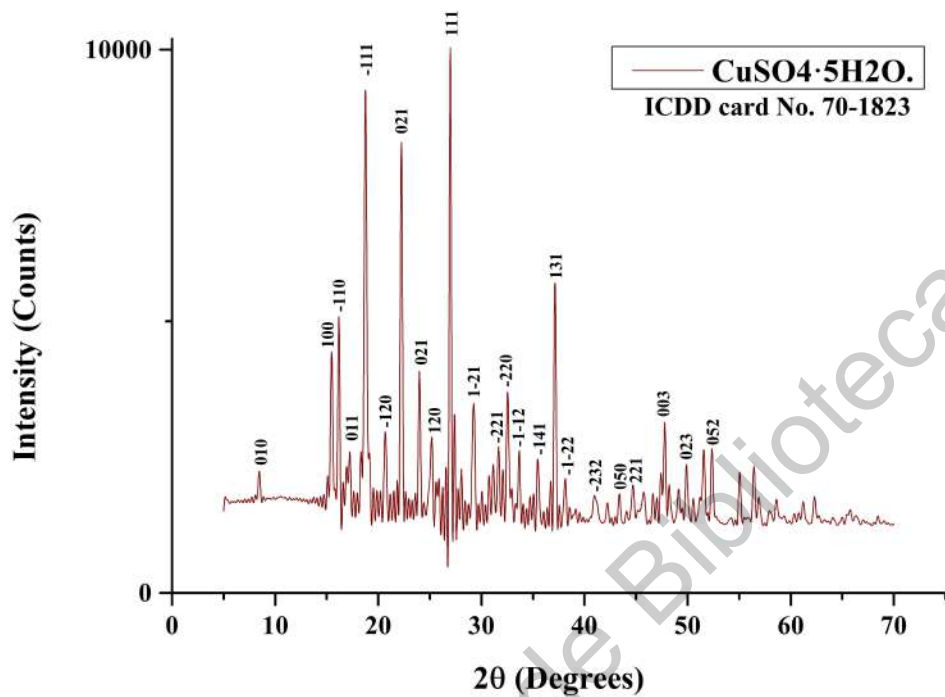


Figura 2.6: Patrón de difracción de rayos X característica del sulfato de cobre ($CuSO_4$). Fuente: elaboración propia.

Ancho a la altura media del pico

Una de las principales aplicaciones de los patrones de difracción de una muestra es que se puede obtener información cuantitativa sobre la calidad de la muestra a través del estudio del parámetro Ancho medio a la mitad del pico o (*FWHM*) o Full Width at the Half Maximum por sus siglas en inglés, para medir la calidad cristalina (*CQ*) de un material, principalmente de tamaño nanométrico ya que pierde precisión al llegar a tamaños cercanos a 100 *nm* y superiores [29, 30].

Este parámetro, de acuerdo a [7], es sensible al tamaño del cristal, estos investigadores mostraron que en el caso de cristales nanométricos de hidroxiapatita el ancho de pico presenta *FWHM* con valores altos, lo que según la literatura correspondería a materiales con baja calidad cristalina. Sin embargo, el alto valor en el *FWHM* está asociado a la contribución simultánea de la dispersión elástica e inelástica de los fotones de alta energía por las nanopartículas.

La calidad cristalina se calcula estudiando el *FWHM* de cualquier pico característico. El más intenso es el comúnmente utilizado para este cálculo, para esto es necesario obtener el *FWHM* para determinar la calidad cristalina de una muestra; si el *FWHM* incrementa, es un reflejo de que la *CQ* disminuye y viceversa; en otras palabras, la línea del pico de difracción varía inversamente con el tamaño de partícula de la muestra. Para calcular la *CQ* del hueso se puede tomar el inverso del valor del *FWHM* [6].

Por otro lado, el tamaño de los cristales se ha calculado mediante la ecuación de Scherrer y el método de Williamson-Hall; es importante aclarar que esta ecuación es para el cálculo de partículas relativamente esféricas, y en el caso de nanocristales de HAp [7], estos presentan estructura hexagonal bien definida y no se considera que esta ecuación tenga mucha aplicación.

El tamaño del cristal se puede determinar utilizando el *FWHM* del pico (002) aplicando la ecuación de Scherrer que se muestra en la ecuación 2.3:

$$\beta_L = \frac{K\lambda}{L \cos(\theta)} \quad (2.3)$$

donde β_{hkl} es el ancho del pico de difracción correspondiente a la dirección (*hkl*) en radianes, $K = 2\sqrt{\frac{\ln(2)}{\pi}} \cong 0.93$ es la constante de Scherrer relacionada con la forma del cristalito y el método utilizado para calcular el tamaño a la que comúnmente se le asigna valor de 1 cuando no se conoce la forma del grano, λ es la longitud de onda del haz de rayos X y L es el tamaño medio del grano, en Å, y θ es el ángulo de Bragg en grados [31]. Lo anterior se puede observar de forma gráfica en la Figura 2.7:

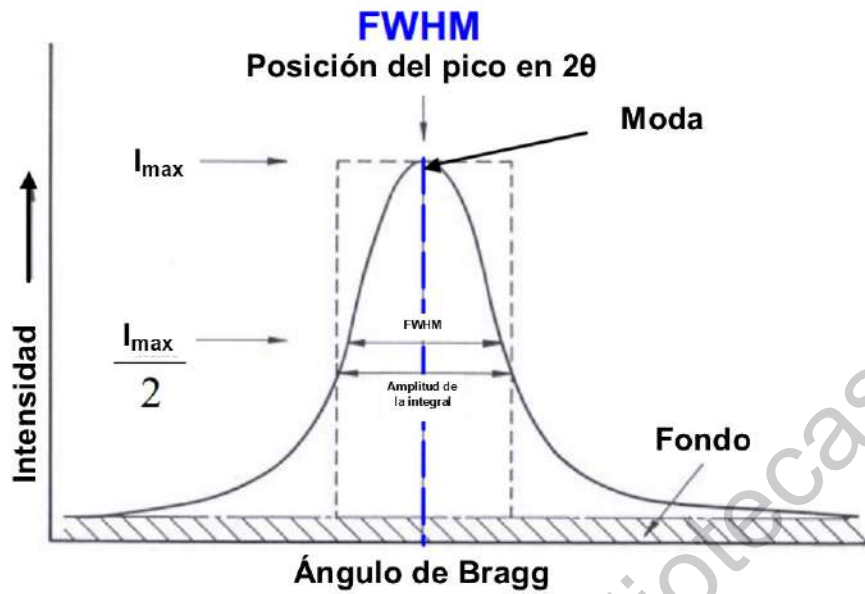


Figura 2.7: Representación gráfica del ancho a altura media de un pico de difracción [32].

La anchura de los picos también se ve afectada por microdeformaciones o defectos. Estos defectos originan un término de tensión con distintos aspectos estructurales, el cual representa los desplazamientos de los átomos desde sus sitios en la estructura cristalina idealizada (véase Figura 2.8).

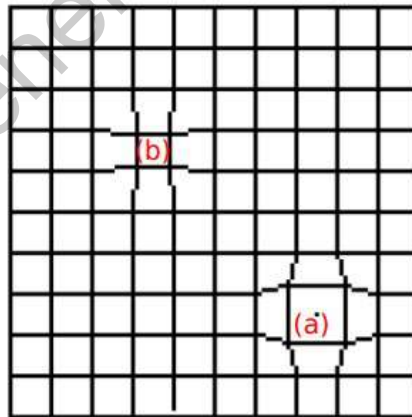


Figura 2.8: Esquema de la tensión producida en la celda unidad, donde se indican dos valores extremos de los desplazamientos de la red d : (a) $d + \Delta d$ y (b) $d - \Delta d$ [30].

Este desplazamiento de los átomos (*strain*) se describe mediante la tensión efectiva ε ,

que se puede obtener considerando dos valores extremos del espaciamiento de la red d con $\varepsilon = \Delta d/d$ y así poder definir la contribución de la anchura provocada por tensiones β_{strain} de acuerdo a la ecuación 2.5:

$$\beta_{strain} = 4 \varepsilon \tan(\theta) \quad (2.4)$$

Williamson y Hall consideraron que el ensanchamiento de los picos de difracción era debido tanto al tamaño de grano β_{size} y a la tensión β_{strain} , por lo que ahora el ancho del pico de difracción sería la suma de los dos anteriores y la ecuación quedaría como:

$$\beta = \frac{K\lambda}{L \cos(\theta)} + 4 \varepsilon \tan(\theta) \quad (2.5)$$

De acuerdo a esta ecuación se tiene un comportamiento lineal, donde el término ε de las tensiones es la pendiente y el corte con el eje y el tamaño de partícula. Si la pendiente es 0, la muestra no tiene deformaciones o tensiones y si pasa por el origen quiere decir que no tiene ensanchamiento de tamaño [30].

2.2.3. Propiedades mecánicas: ensayo de compresión

El comportamiento mecánico de los materiales es debido a una respuesta de éstos a cargas mecánicas o deformaciones, la cual puede ser descrita en términos de los efectos básicos de las cargas mecánicas sobre defectos o movimiento atómico [33].

Se le llama ensayo de compresión al proceso en el cual se somete una probeta normalizada de un material a un esfuerzo axial progresivo de compresión hasta que se produzca la ruptura. Este ensayo mide la resistencia de un material a una fuerza estática aplicada lentamente, para esto es necesario colocar la probeta en una máquina universal de ensayos la cual consta de dos soportes o mordazas, una fija y la otra movable, se le aplica fuerza a la probeta del material y se produce la carga al momento de desplazar el soporte móvil a una velocidad determinada. La celda de carga que se encuentra depositada en el soporte fijo registra una señal que representa la fuerza aplicada.

En la Figura 2.9 se observa la distribución de las piezas involucradas en un ensayo de compresión realizado en una máquina universal de ensayos.

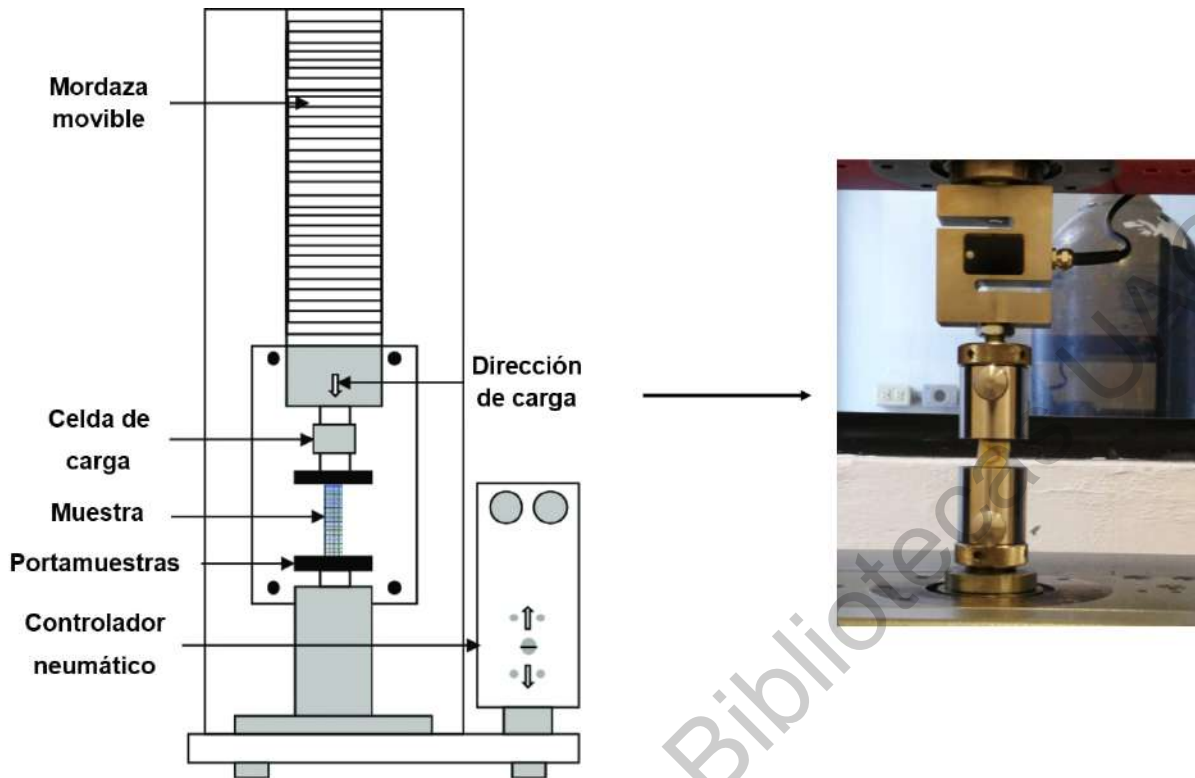


Figura 2.9: Diagrama de los componentes de una máquina universal de ensayos [34].

Los puntos de la curva de esfuerzo (en $\frac{N}{m^2}$) versus la deformación unitaria ε se van graficando a medida que se generan y los resultados se registran en un diagrama de esfuerzo-deformación en el que en un eje se representa el desplazamiento y en el otro eje la tensión aplicada.

Compresión

Como se muestra en la Figura 2.10, compresión es el proceso en el cual un cuerpo está siendo comprimido por una presión P . El esfuerzo asociado con esta deformación (P) da lugar a un cambio en el volumen y la compresión se puede definir ahora como el cambio fraccional de volumen $\frac{\Delta V}{v}$. La presión se denota como un estrés negativo para una disminución en el volumen [35].

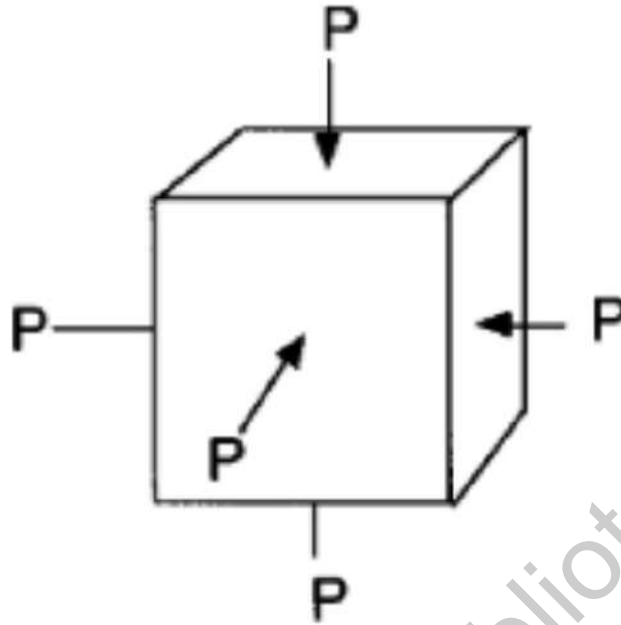


Figura 2.10: Geometrías básicas del modo de deformación de compresión [35].

Esfuerzo

Esto es la resistencia de un material a fuerzas o cargas externas el cual por definición se expresa en términos de fuerza ejercida (F) dividida sobre área del material (A) en la que actúa [35].

En el caso del esfuerzo normal, éste se produce perpendicular a la superficie y se representa con el símbolo σ . Lo anterior se puede observar en la ecuación 2.6:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (2.6)$$

donde se asume que el esfuerzo es el mismo en toda el área, de tal forma que éste se encuentre uniformemente distribuido. Cuando se aplica una carga a un material lo que se mide es la fuerza y el área en la que ésta se está aplicando para así obtener el esfuerzo. Su unidad son los mega pascales: $1MPa = 10^6 \frac{N}{m^2}$.

Deformación

La deformación unitaria ε es la respuesta de deformación física de un material al aplicarle un esfuerzo, se puede representar de forma matemática como en la ecuación 2.7 donde la

longitud original de la probeta es L_0 , L es la longitud actual de la muestra y el cociente entre el acortamiento es ΔL .

$$\varepsilon = \frac{L - L_0}{L_0} = \frac{\Delta L}{L_0} \quad (2.7)$$

Ley de Hooke

La Ley de Hooke establece que la deformación del material es proporcional a la tensión aplicada dentro del límite elástico de ese material. Matemáticamente se puede expresar de forma general como en la ecuación 2.8:

$$F = -kx \quad (2.8)$$

donde F es la fuerza, k es la constante del resorte y x la longitud de la extensión.

En términos de propiedades mecánicas y utilizando el módulo de elasticidad o de Young, la ley de Hooke se puede expresar de acuerdo a la ecuación 2.9:

$$\sigma = E \times \varepsilon \quad (2.9)$$

donde σ es el esfuerzo, ε es la deformación y a E se le llama *módulo de elasticidad o de Young* el cual es característico del material el cual es una medida de las fuerzas de unión interatómicas de ese material. Cuando un material es rígido o este ofrece una mayor resistencia a ser deformado las fuerzas de unión son mayores.

En el diagrama de la curva de esfuerzo-deformación, el módulo de Young es la pendiente ya que tiene una relación estrecha con la energía de enlace atómico. Si se observa que la pendiente es pronunciada esto quiere decir que se requieren grandes fuerzas para separar los átomos y hacer que el material se estire de forma elástica por lo cual este material tiene un módulo de Young grande. Para el caso de los cerámicos el módulo de elasticidad depende de la magnitud de la porosidad [36].

Es importante recalcar que el módulo de Young de los materiales compuestos depende de la rigidez de los componentes individuales.

Diagrama esfuerzo-deformación

El diagrama de la curva de esfuerzo-deformación se utiliza para registrar y determinar el comportamiento de un material bajo varios niveles de tensión/esfuerzo hasta que se rompe o se fractura.

En la Figura 2.11 se pueden observar cinco puntos característicos:

1. **Límite de proporcionalidad:** aquí las deformaciones del material son proporcionales a los esfuerzos y más allá de este punto el material no se comporta de acuerdo a la ley de Hooke.

2. **Límite elástico:** hasta este punto de la curva las deformaciones se distribuyen a lo largo de la probeta y son de pequeña magnitud, es el punto hasta el cual el material vuelve a su posición original cuando la carga que actúa sobre él se retira por completo. Más allá de este límite, el material no vuelve a su posición original y comienza a aparecer una deformación plástica. Al estar más allá de esta zona se producirá una recuperación parcial de la forma de la probeta quedando deformada definitivamente.
3. **Límite de fluencia o cedencia:** se define como el punto en el que la probeta del material comienza a deformarse plásticamente de forma brusca sin incremento de la carga aplicada. Una vez superado el límite de elasticidad, se produce una deformación plástica permanente. La fluencia se da cuando las impurezas o los elementos del material bloquean las dislocaciones de la red cristalina impidiendo su deslizamiento. Al alcanzar el límite de cedencia se logran las dislocaciones y se produce una deformación bruscamente. Este fenómeno no está presente en todos los materiales.
4. **Punto de máxima tensión/esfuerzo:** en este punto se encuentra el valor máximo de tensión que es capaz de soportar el material. A partir de este punto las deformaciones se concentran en la parte central de la probeta.
5. **Esfuerzo de ruptura:** es el punto de la curva tensión-deformación en el que se produce la ruptura del material donde las deformaciones se acumularon hasta la ruptura de la probeta en esta zona.

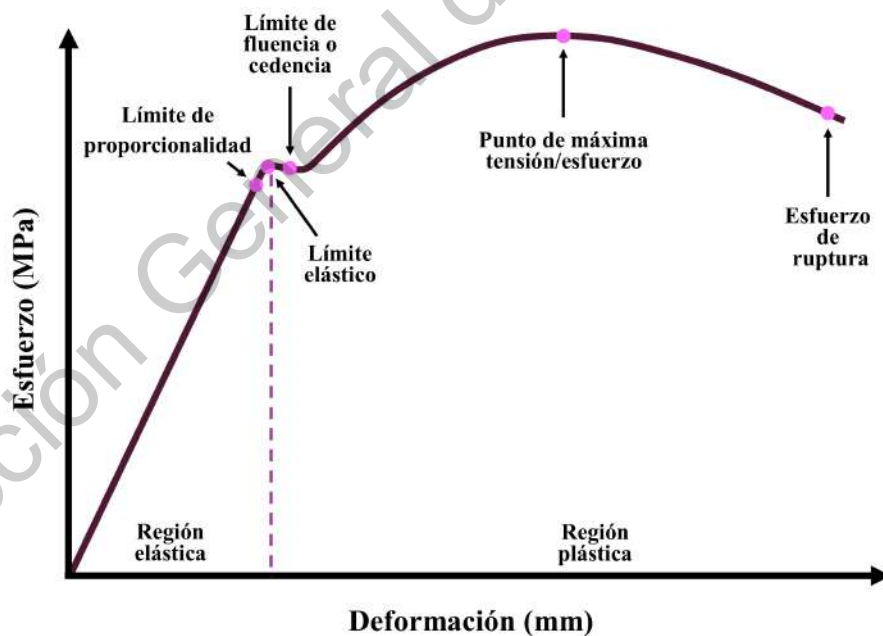


Figura 2.11: Diagrama esfuerzo-deformación. Fuente: elaboración propia.

Metodología

En este capítulo se detalla la metodología de investigación realizada para la presente tesis en el Laboratorio de biocerámicos del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA), UNAM Juriquilla, Querétaro, Qro.

En la Figura 3.1 se presentan de forma gráfica los pasos que se siguieron para la obtención y tratamiento de muestras de hueso trabecular bovino.

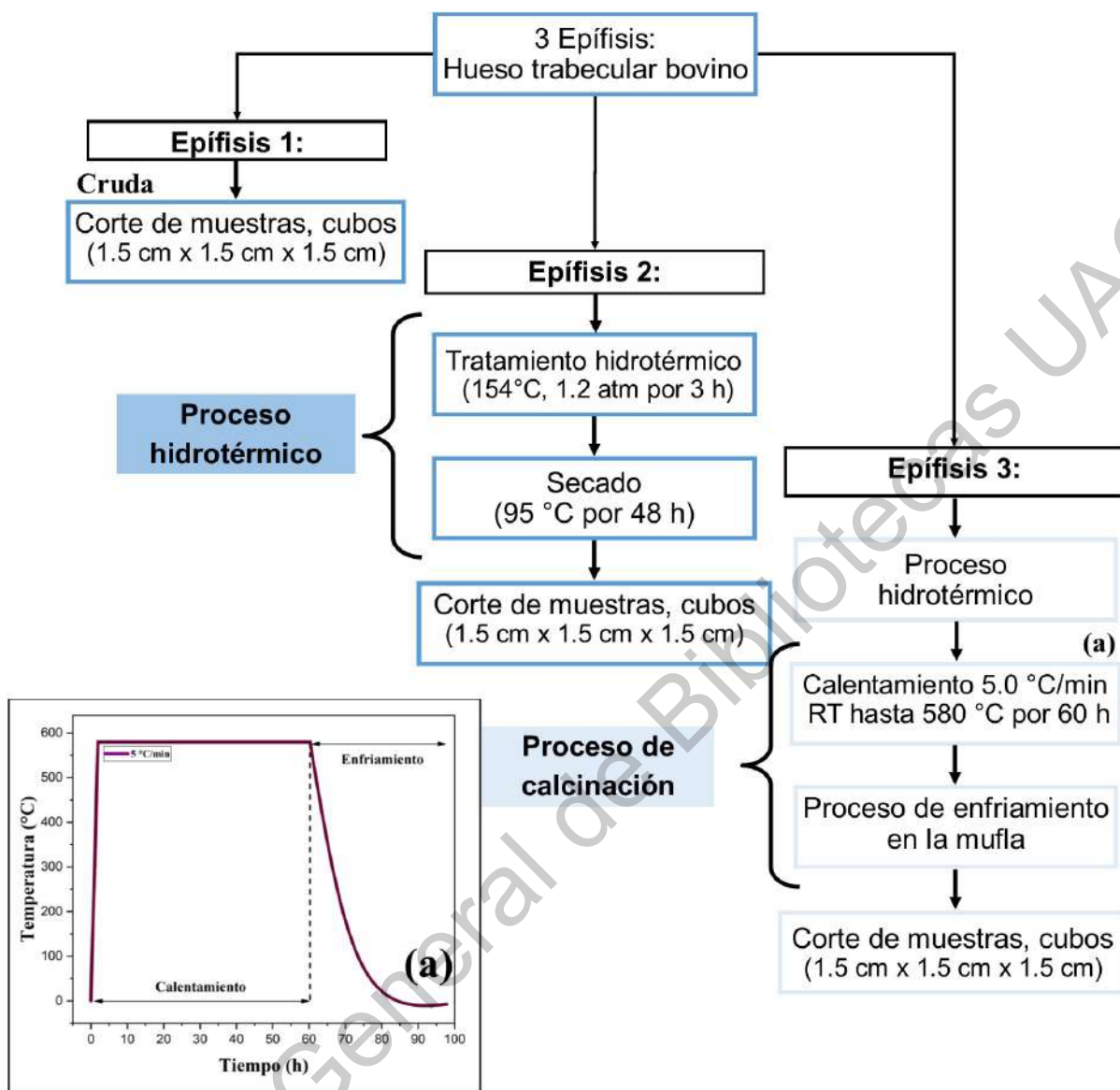


Figura 3.1: Diagrama de bloque para obtener y caracterizar las muestras del hueso. a) Perfil térmico del proceso de calcinación. Fuente: elaboración propia.

3.1. Obtención de muestras

Se obtuvieron tres cabezas femorales bovinas en un mercado local en las inmediaciones del centro de investigación, a cada una se le realizaron diferentes tratamientos térmicos los cuales se detallarán en la siguiente subsección. Con esto se plantea la variación en la composición de las muestras.

- La primera cabeza femoral fue utilizada al natural para así analizar el comportamiento

del hueso con las fases tanto orgánica como inorgánica que lo componen.

- A la segunda cabeza femoral se le realizó un tratamiento hidrotérmico por triplicado para realizar una remoción superficial de grasas y proteínas.
- La tercera cabeza femoral recibió un tratamiento hidrotérmico como la cabeza anterior y se adicionó un proceso de calcinación con el objetivo de remover a mayor profundidad el contenido de grasas y proteínas del tejido óseo.

Para la obtención de muestras se utilizó una mini sierra circular de mesa marca Chicago Electric con una potencia de 0.9 W como se muestra en la Figura 3.2. El corte de las cabezas se realizó de acuerdo al diagrama de la Figura 3.3 donde se hicieron cortes transversales y longitudinales en forma de cubos con medidas aproximadas de 1.5 cm de lado como se observa en la Figura 3.4.



Figura 3.2: Mini sierra circular Chicago Electric. Fuente: CFATA-UNAM.

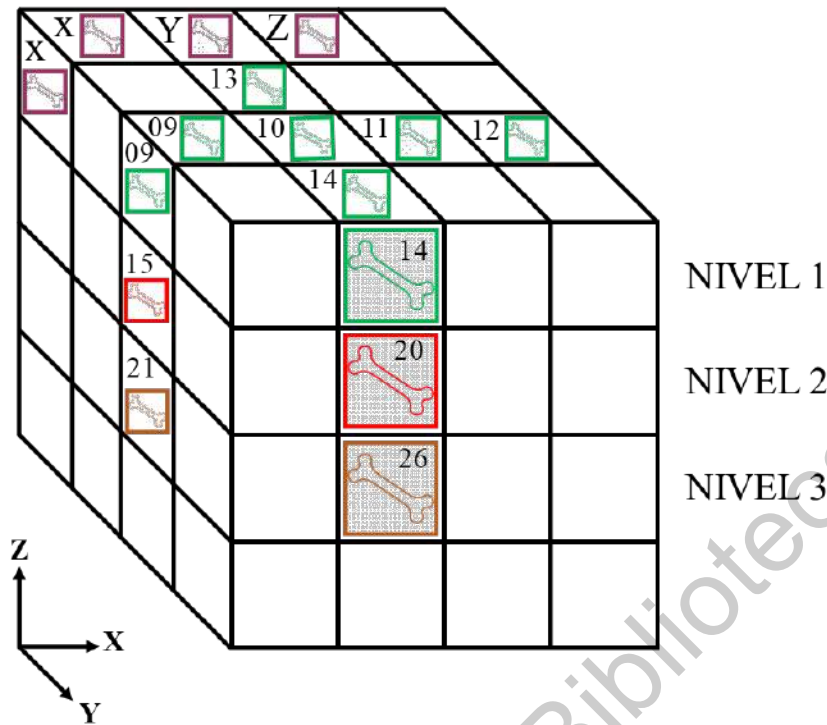


Figura 3.3: Diagrama de las posiciones de las muestras cúbicas. Fuente: elaboración propia.

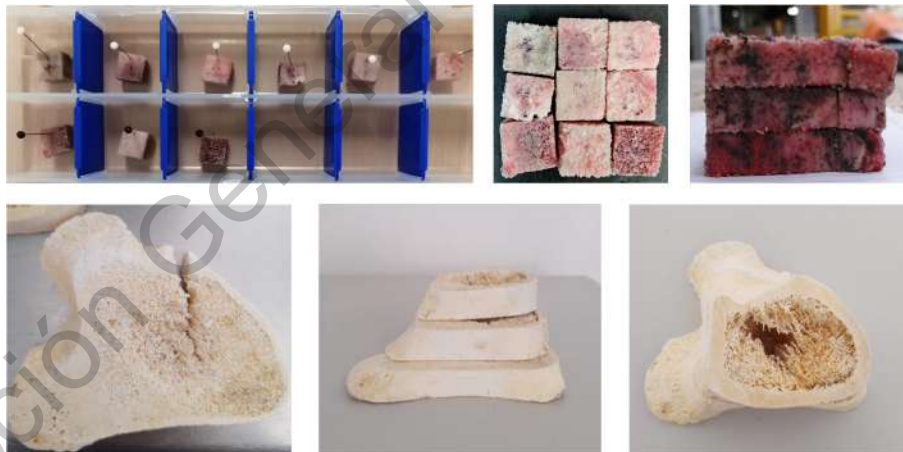


Figura 3.4: Corte de muestras cúbicas de hueso trabecular bovino. Fuente: elaboración propia.

3.1.1. Dependencia de la posición

Como se puede observar en la Figura 3.3, se eligieron 6 muestras de cada uno de los 3 niveles diferentes seleccionados del cubo principal para así tener un total de 18 cubos para

ser analizados en el plano XY (dirección Z) y así observar los resultados obtenidos al realizar pruebas de compresión debido al cambio en la posición de la muestra en el cubo principal.

3.1.2. Dependencia de la composición y dirección

Para la selección de cubos para los análisis dependientes de la composición y la dirección X, Y y Z del hueso, se eligieron 3 muestras independientes a las anteriormente mencionadas de la parte posterior del primer nivel del cubo principal de cada una de las cabezas femorales para obtener un total de 9 cubos de 1.5 cm de lado.

3.2. Tratamientos térmicos

3.2.1. Hidrotérmico

A las muestras cúbicas seleccionadas para los análisis de dependencia de composición se les realizó un tratamiento hidrotérmico previo al corte para desnaturalizar y remover superficialmente proteínas, colágeno y grasa.

Esto se llevó a cabo en una autoclave All American 1915x en condiciones de temperatura y presión altas (154 °C, 1.2 atm), el proceso se repitió tres veces con cambio de agua en cada ocasión. Posteriormente se secaron en un horno a 95 °C durante 48 h, Figuras 3.5 y 3.6.



Figura 3.5: Autoclave All American 1916x. Fuente: CFATA-UNAM



Figura 3.6: Proceso hidrotérmico. Fuente: CFATA-UNAM.

3.2.2. Calcinación

El proceso de calcinación en las muestras de la tercera cabeza femoral fue realizado a $580\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una velocidad de calentamiento de $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ por 60 h en una mufla Felisa modelo FE-361 (San Juan de Ocotán Zapopan, Jalisco, México) que se observa en la Figura 3.7, realizando el control de temperatura con un controlador novus ® N480D, para una remoción profunda de grasas y proteínas. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente dentro de la mufla.



Figura 3.7: Mufla Felisa modelo FE-361. Fuente: CFATA-UNAM.

3.3. Caracterización fisicoquímica

3.3.1. Microscopía electrónica de barrido

El análisis morfológico de las muestras, con tratamiento hidrotérmico, dependientes de la dirección, se realizó en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6060 ilustrado en la Figura 3.8 con un voltaje de aceleración de electrones de 20 *kV*. Las imágenes fueron capturadas con aumentos de 15 ×, 50 × y 100 ×.



Figura 3.8: Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6060. Fuente: CFATA-UNAM.

3.3.2. Difracción de rayos X

Los patrones de *XRD* de las muestras con tratamiento hidrotérmico se llevaron a cabo en un instrumento de difracción Rigaku Ultima IV, Figura 3.9, operando a 35 *kV*, 15 *mA* con longitud de onda de radiación *CuK α* de 1.5406 Å. Los difractogramas obtenidos fueron de 5 a 80° en una escala de 2θ con un tamaño de paso de 0.02 °. Se estudiaron muestras de hueso trabecular bovino crudo, en los planos XY, XZ y YZ para evaluar la influencia de la dirección en los patrones.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el software MDI Jade 6.0 para la identificación de fases cristalinas y cálculo del *FWHM*.



Figura 3.9: Difractómetro de rayos X Rigaku Ultima IV. Fuente: CFATA-UNAM.

3.3.3. Propiedades mecánicas

Las pruebas de compresión se llevaron a cabo en una máquina universal de pruebas marca Zwick / Roell modelo Z005 con una celda de carga de 5000 N a una velocidad de 1 mm/min como se muestra en las Figuras 3.10 y 3.11.



Figura 3.10: Máquina universal Zwick / Roell Z005. Fuente: CFATA-UNAM.



Figura 3.11: Ensayo de compresión en máquina universal. Fuente: elaboración propia.

Resultados y discusiones

4.1. Microscopía electrónica de barrido

Se muestran en la Figura 4.1 las micrografías de un andamio de hueso trabecular con ampliaciones de $15 \times$, $50 \times$ y $100 \times$. Las Figuras A), B), C) son referentes al plano YZ (dirección X), la D), E) y F) el plano XZ (dirección Y), y G), H) e I) al plano XY (dirección Z), respectivamente.

Se observa que la morfología y orientación de los poros dependen del plano en el que se esté viendo la muestra, en la Figura G) se ve con mayor claridad que la microarquitectura del hueso trabecular está orientada preferencialmente en la dirección Z y que existen diversos tamaños de poro.

La arquitectura está formada por trabéculas y poros los cuales tienen orientación preferencial. Como se mencionó con anterioridad, el hueso tiene porosidad nanométrica, micrométrica y macrométrica [37]. La nano ocurre entre los nanocristales que conforman una trabécula, la micrométrica donde están las lagunas de osteocitos y los canales de canalículos y por último la macrométrica, donde se observan los túneles y andamios del hueso que contienen a los vasos sanguíneos, así como canales longitudinales y transversales.

La morfología de los poros varía entre círculos, óvalos y en algunos casos es amorfa posiblemente debido al corte de las muestras. Esta porosidad y el tipo de poro varían para tener una buena distribución de sangre, colágeno y otros nutrientes que contribuyen a la regeneración ósea.

Gracias a estas imágenes se pueden observar las trabéculas interconectadas y su arreglo tridimensional anisotrópico.

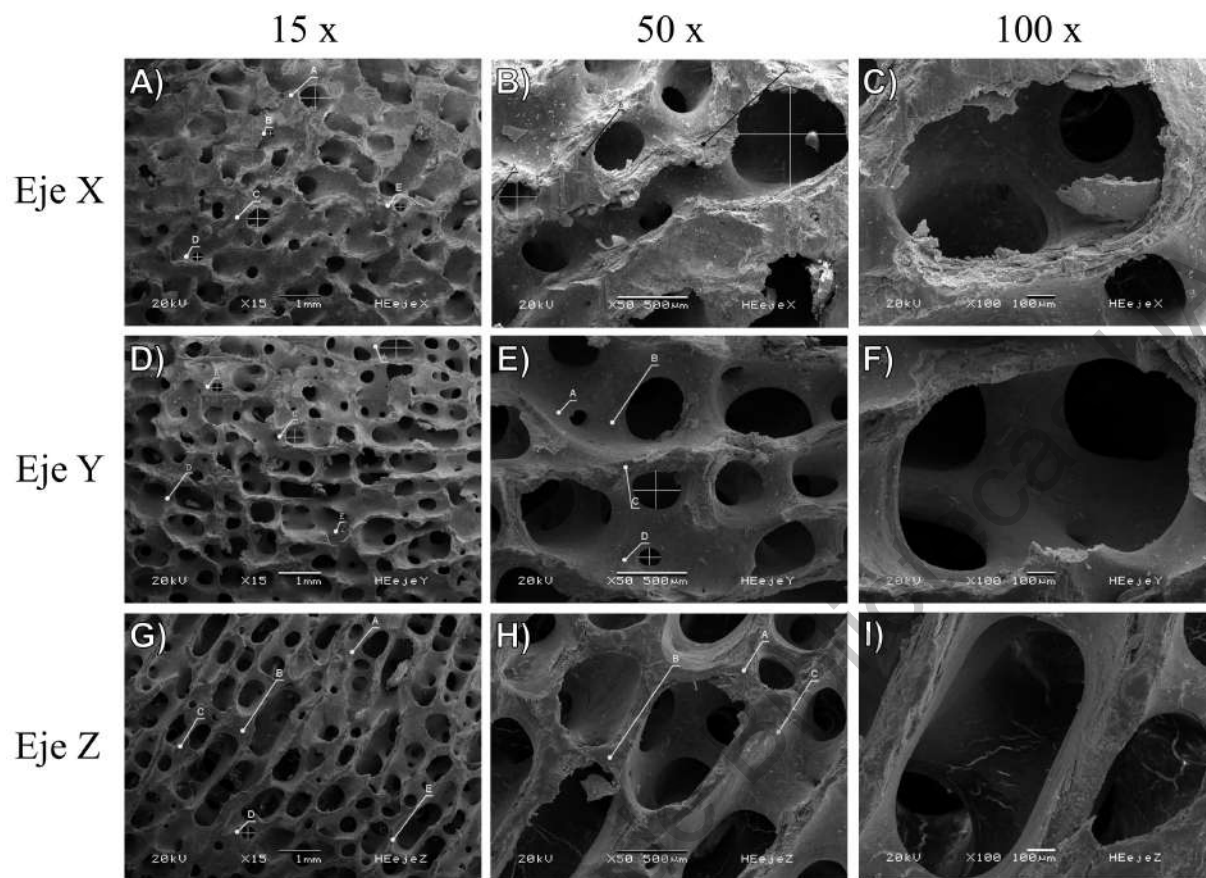


Figura 4.1: Micrografías *SEM* de la microarquitectura del hueso trabecular bovino con ampliaciones de 15 ×, 50 × y 100 ×. Fuente: elaboración propia.

Tabla 4.1: Promedio del tamaño de poros en micrografías SEM.

Ampliación		Eje X	Eje Y	Eje Z
		Promedio (mm)		
15 x	Alto	0.3266	0.333	0.9558
	Ancho	0.3828	0.5154	0.4664
50 x	Alto	0.4491	0.244	0.6177
	Ancho	0.4395	0.2383	0.4389
100 x	Alto	1.019	3.5535	0.3393
	Ancho	0.6725	5.7819	0.0897

La porosidad trabecular se debe a los espacios medulares intertrabeculares. Se considera que la porosidad es inversamente proporcional a varias propiedades mecánicas, como la resistencia ósea y la rigidez.

4.2. Difracción de rayos X

La Figura 4.2 muestra los patrones de *XRD* correspondientes a las trabéculas desproteinizadas y desgrasadas de hueso trabecular bovino para los planos YZ (dirección X), XZ (dirección Y) y XY (dirección Z). Las muestras se analizaron posterior al tratamiento hidrotérmico para evitar la contribución de picos de difracción correspondientes a grasa y proteína. Estos patrones están formados por picos anchos que de acuerdo a [7] se originan por la contribución simultánea de la dispersión elástica e inelástica de fotones. De acuerdo a [38] estas contribuciones son imposibles de separar. Las líneas punteadas en esta Figura corresponden a la indexación de estos patrones con el *PDF* 00-009-0432 que identifica la HAp. Dos características son interesantes en estos patrones. Primero, hay una orientación preferencial perpendicular al plano XY (dirección Z), y segundo, un desplazamiento a la izquierda en relación al plano (002), lo que indica un aumento en la distancia interplanar ya que la estructura cristalina está distorsionada como consecuencia del peso soportado en la dirección Z y que el hueso es comprimido en el plano XY.

La orientación preferencial está relacionada con la característica de que el hueso se encuentra precargado para poder soportar el peso del cuerpo así como por la dirección del hueso en crecimiento [6], esto se puede observar claramente en la Figura 4.2 ya que los picos de difracción están mejor definidos en la dirección Z, lo que quiere decir que tiene una mejor cristalinidad. También es importante resaltar que el desplazamiento de los picos está directamente relacionado con la presencia de otros iones en la estructura HAp como Na^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Si^{2+} , Ba^{2+} , F^- , Ca_3^{2-} , entre otros [16]. El hueso es un material anisotrópico aunque tiene la misma estructura (hexagonal) y composición.

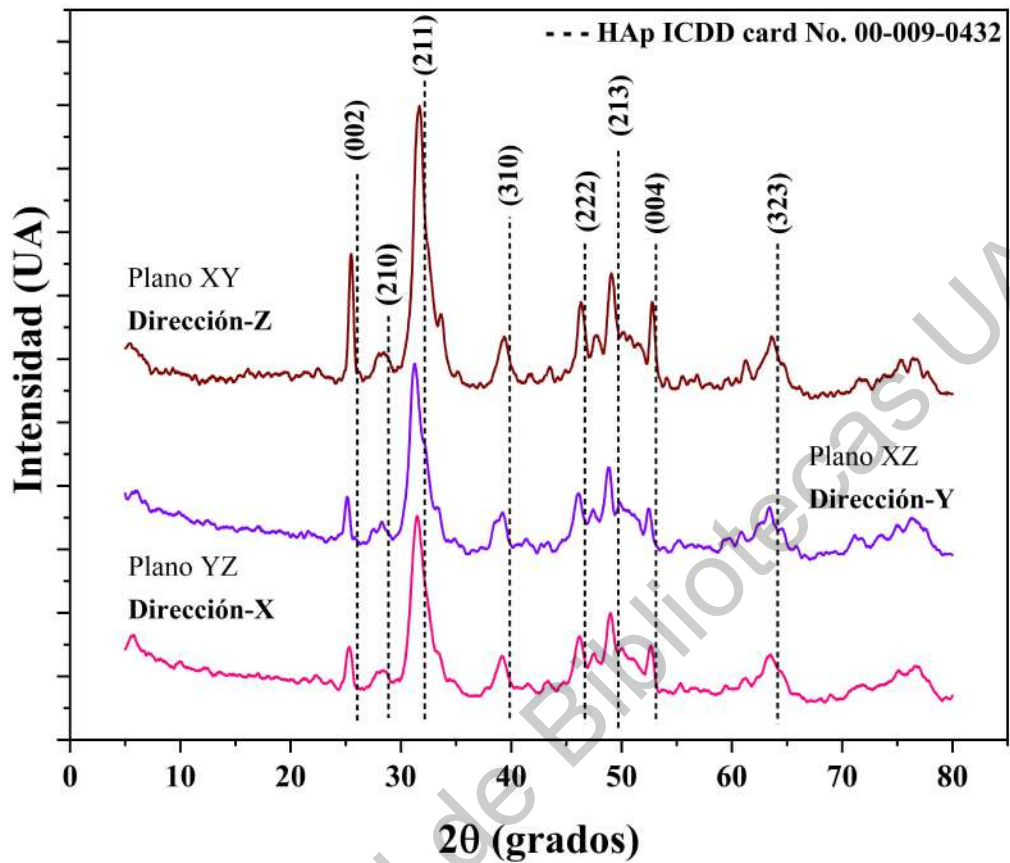


Figura 4.2: Patrones *XRD* para cada lado de un cubo de muestra. Fuente: elaboración propia.

La Figura 4.3 muestra los cambios en la medición del (*FWHM*) para el pico ubicado alrededor de los 25.349° que corresponde a la difracción del pico (002) de cada eje. Este parámetro se ha tomado como indicativo del tamaño del cristal y de la calidad cristalina de la muestra (HAp semicristalina), sin embargo, cuando la muestra es nanométrica, los ensanchamientos están relacionados con contribuciones simultáneas de dispersión elásticas e inelásticas de los fotones. El *FWHM* se puede utilizar para determinar el tamaño del cristal mediante la ecuación de Scherrer o el método de Williamson-Hall.

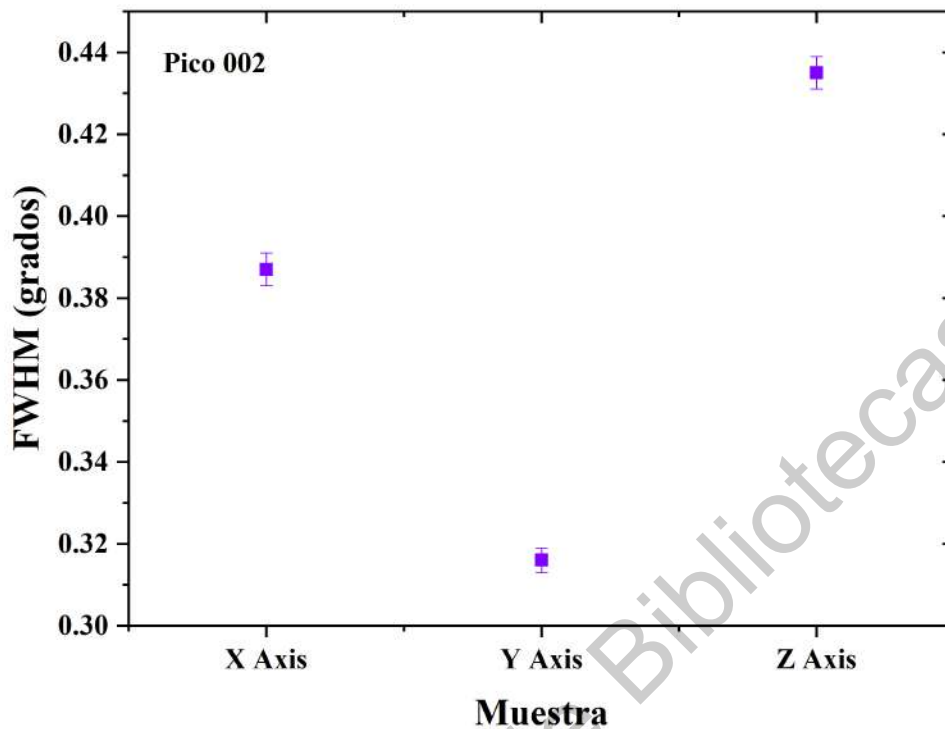


Figura 4.3: Valores del *FWHM* para el pico de difracción (002). Fuente: elaboración propia.

En la Figura 4.4 A) se observa el cálculo del tamaño de cristal para los picos característicos de la muestras analizadas en la dirección X, Y y Z. En la 4.4 B) el promedio del tamaño de cristal para cada eje.

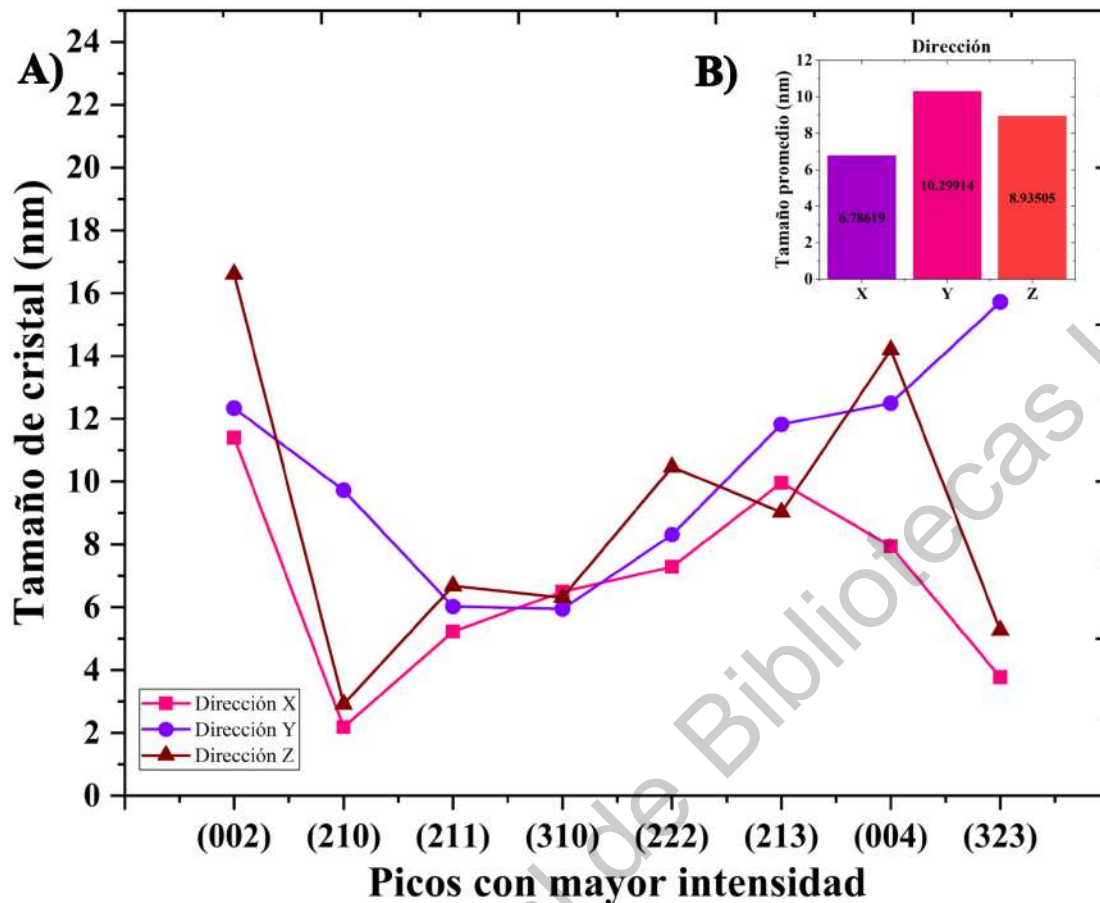


Figura 4.4: A) Tamaño de cristal para los picos de difracción con mayor intensidad en las direcciones X, Y y Z. B) Promedio del tamaño del cristal en cada dirección. Fuente: elaboración propia.

En el pico de mayor intensidad de difracción (002) se puede observar de acuerdo a la Figura 4.4 que en la dirección Z es donde se tiene un tamaño de cristal mayor, por lo que con esto se confirma lo observado en el difractograma y en el cálculo del *FWHM* los cuales señalan que el hueso se encuentra precargado en la dirección Z ya que es donde se tiene mayor resistencia mecánica al peso corporal.

4.3. Propiedades mecánicas

El hueso trabecular es anisotrópico tanto en módulo como en resistencia. A medida que el hueso trabecular se vuelve más poroso, su resistencia a la compresión se vuelve más anisotrópica. En la literatura se encuentran diferentes resultados de estos análisis debido a que los valores dependen de múltiples factores como el tipo y origen del hueso, la edad, sexo

y enfermedades del espécimen de donde proviene la muestra, el contenido mineral, humedad, contenido orgánico, etc.

4.3.1. Dependencia de la posición

En la Figura 4.5 se pueden observar los resultados obtenidos de una prueba de compresión realizada a 6 cubos (muestras) por nivel, provenientes de una cabeza femoral bovina. Dependiendo de la ubicación en el cubo tridimensional se le asigna un color así como un número. Todas las pruebas de compresión con dependencia de posición fueron realizados en el plano XY (dirección Z).

El diagrama de esfuerzo-deformación y el correspondiente módulo de Young de las 6 muestras del primer nivel de la cabeza femoral están ilustradas en las Figuras 4.5 A) y B). El segundo nivel en la Figuras 4.5 C) y D) y el tercero en las Figuras 4.5 E) y F).

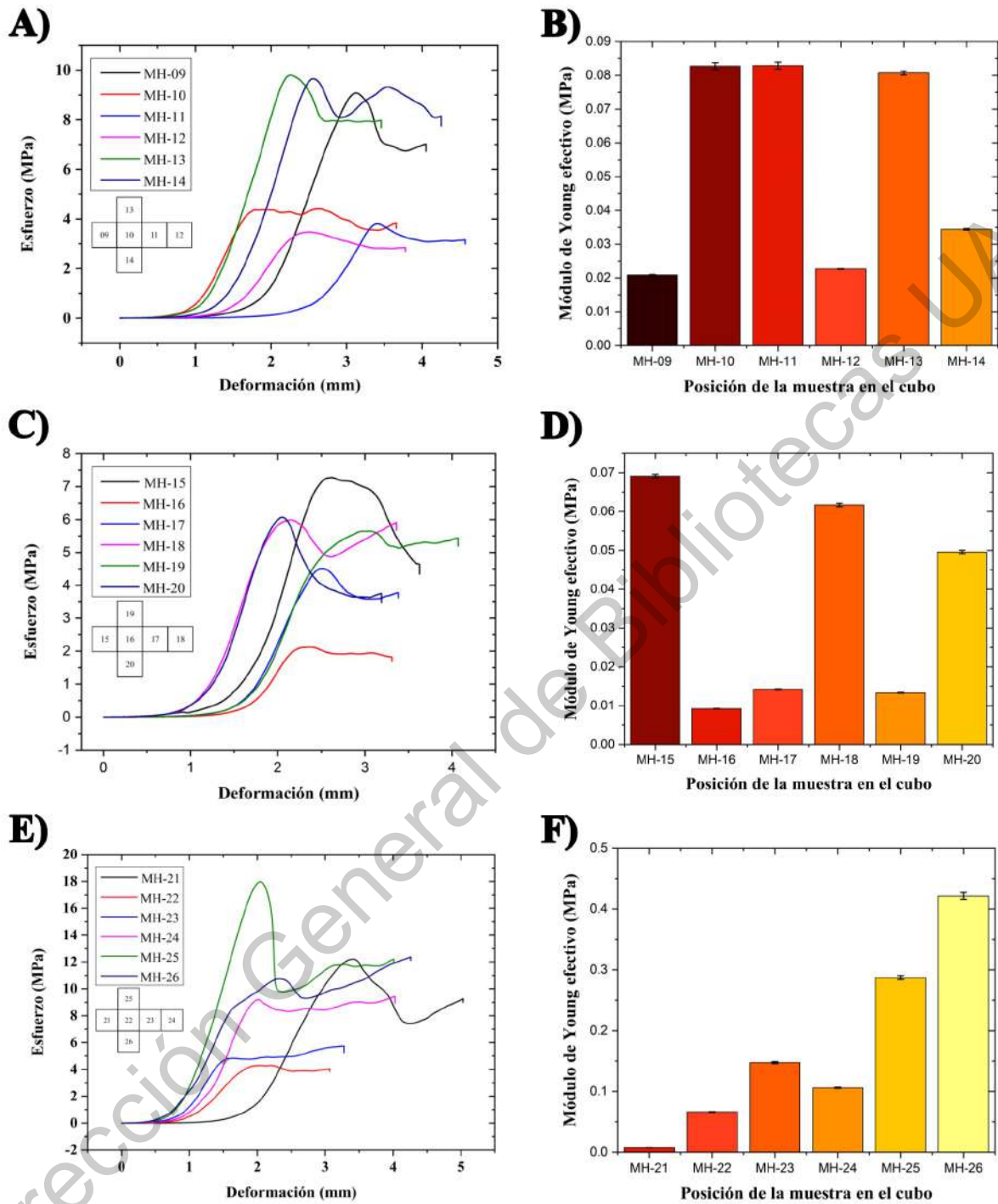


Figura 4.5: Diagrama de esfuerzo-deformación y módulo de Young para las muestras de A) y B) primer nivel, C) y D) segundo nivel, E) y F) del tercer nivel del cubo de hueso trabecular bovino, respectivamente. Fuente: elaboración propia.

Dentro de cada diagrama esfuerzo-deformación se encuentra una figura en forma de cruz donde se muestra el acomodo de los cubos en la cabeza femoral. Basado en esto y en la Figura 4.6 se pueden interpretar los resultados obtenidos ya que los valores de tolerancia a la compresión y módulo de Young dependen de su cercanía a la unión de la cabeza femoral con la cadera.

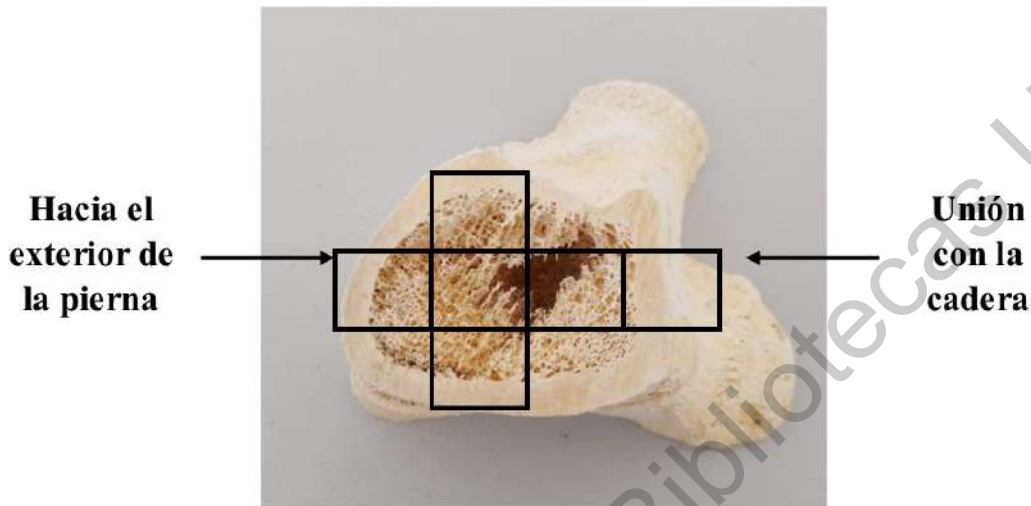


Figura 4.6: Ubicación de la cabeza femoral. Fuente: elaboración propia.

En la Figura 4.5 A) se tiene que la muestra MH-12 es la que tiene el menor valor de fuerza máxima (F_{max}) al tener 826.26 N y por el contrario la fuerza máxima con el valor superior se encuentra en la muestra MH-14 con 2229.46 N . Las muestras MH-10, MH-11 y MH-13 tienen módulos de Young muy similares con valores de 0.08272 MPa , 0.08288 MPa y 0.08072 MPa respectivamente.

Para el segundo nivel, el valor más alto de fuerza máxima corresponde a la muestra MH-15 con 1502.38 N con el módulo de Young más alto al tener 0.06913 MPa , el valor mínimo de F_{max} con 480.10 N a la muestra MH-16.

En el tercer y último nivel, el cubo MH-25 es el que toleró mayor fuerza con un valor de 4145.13 N mientras que el cubo MH-22 con 965.39 N es el que tiene menor resistencia a la compresión. El módulo de Young de la muestra MH-26 es el mayor 0.4172 MPa .

De acuerdo a los valores detallados con anterioridad, estos comportamientos pueden ser explicados como que la resistencia a la compresión es mayor en las orillas del hueso en comparación con las muestras tomadas del centro de la cabeza femoral. Las propiedades mecánicas del hueso varían dependiendo de la posición debido a que la fisionomía del cuerpo requiere mayor resistencia en el exterior de las cabezas femorales y disminuye hacia el interior. Conforme a la variación de resistencias del hueso en el nivel en el que se tomaron las muestras

se observa que el nivel dos es el que presenta una cedencia más rápida a la compresión.

También es importante destacar que en los tres niveles y sus correspondientes cubos se observa que posterior al punto de máximo esfuerzo y ruptura parece como si las muestras soportaran una carga mayor pero esto es debido al reacomodo de las trabéculas colapsadas, lo que genera resistencia a la compresión con un comportamiento elástico-plástico. La arquitectura del hueso trabecular es porosa para así poder dispersar la energía de compresión y movimiento en general entre las trabéculas.

4.3.2. Dependencia de la composición y dirección

En la Figura 4.7 se muestran el diagrama de esfuerzo-deformación y los resultados del cálculo del módulo de Young de muestras a las que se les realizaron pruebas variando la dirección de compresión así como la composición del hueso.

Las Figuras 4.7 A) y B) ilustran las pruebas mecánicas de resistencia a la compresión de hueso crudo y módulo de Young en los planos YZ (dirección X), XZ (dirección Y) y YZ (dirección Z). Las muestras de hueso con tratamiento hidrotérmico se encuentran en las Figuras 4.7 C) y D) en las mismas direcciones que el hueso crudo así como las muestras que se comprimieron después de haber sido calcinadas, Figuras 4.7 E) y F), respectivamente.

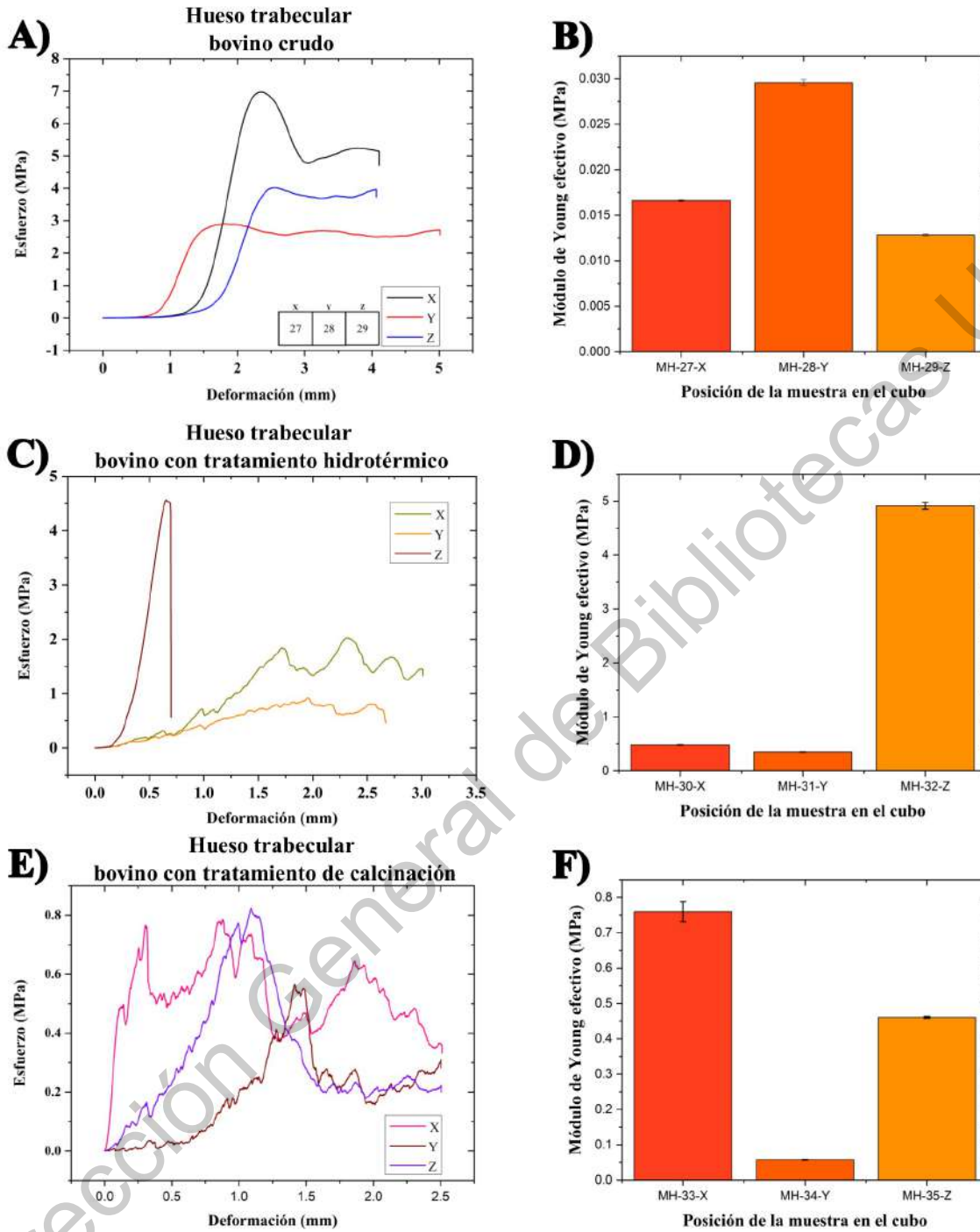


Figura 4.7: Diagrama de esfuerzo-deformación y módulo de Young para las muestras de A) y B) hueso crudo, C) y D) con proceso hidrotérmico, E) y F) con proceso hidrotérmico + calcinación en las direcciones X, Y y Z, respectivamente. Fuente: elaboración propia.

En el diagrama esfuerzo deformación (A) del hueso crudo se obtuvo el valor de fuerza máxima al comprimirlo en la dirección X con 1473.82 *N*, el valor mínimo fue en la dirección Y con 692.40 *N*, en esta dirección es donde se presenta un mayor módulo de Young con 0.02958 MPa.

Para el caso de los cubos de hueso trabecular bovino con tratamiento hidrotérmico donde se removieron grasas y proteínas; el valor más alto y más bajo de F_{max} fueron 925.72 *N* y 217.18 *N* para las direcciones Z y X respectivamente, mientras que el módulo de Young más grande fue el de la dirección Z con un valor de 4.9142 MPa.

Por último, las muestras calcinadas de hueso con una remoción total de fase orgánica presentaron el valor más alto de fuerza máxima a la compresión en la dirección Z con 174.29 *N* y el menor valor en la dirección Y con 111.81 *N*, así como un módulo de Young de 0.75947 MPa en la dirección X.

A partir de los resultados presentados se puede observar que las propiedades mecánicas de un hueso trabecular dependen mucho de su compleja estructura así como de la composición química orgánica e inorgánica. En general los valores más grandes de resistencia a la compresión se encuentra en las muestras de hueso crudo, esto es debido al gran aporte de la fase orgánica compuesta de agua, grasas, proteínas, colágeno, sangre, entre otros, a las propiedades mecánicas del material óseo. En las muestras con procesos térmicos como el hidrotérmico y la calcinación se observa una concordancia con los experimentos anteriores de *SEM* y *XRD* ya que la dirección Z es la que presenta una mayor resistencia a la compresión.

El plano XY del hueso con tratamiento hidrotérmico presenta una fractura muy abrupta debido a la posición de donde se tomó la muestra ya que en este cubo existía una línea de crecimiento del hueso en donde las propiedades mecánicas son considerablemente mejores en comparación con las muestras en donde no se encuentra este comportamiento ya que el hueso aquí presenta una mayor densidad, por lo tanto menor porosidad.

Conclusiones

Se confirmó por medio de *SEM*, *XRD* y pruebas mecánicas de resistencia a la compresión que el hueso trabecular es un material anisotrópico, con dependencia significativa en la composición orgánica e inorgánica del hueso trabecular bovino extraído de una cabeza femoral, así como la dirección y posición de extracción y análisis de las muestras.

Gracias a los análisis de *SEM* se observaron las diferentes morfologías, porosidades y tamaños de poro de los andamios trabeculares dependiendo de la dirección en la que se analizaron los cubos. En la dirección Z se puede ver que las trabéculas presentan una orientación de crecimiento preferencial mientras que en la dirección X y Y estas crecen aparentemente de forma aleatoria.

Al realizar las muestras mediante *XRD* se obtuvieron resultados concluyentes de la influencia de la dirección de análisis y extracción de las muestras observando los picos de difracción de cada dirección así como los valores de *FWHM* en el pico característico (002) y el tamaño de cristal en las direcciones X, Y y Z donde Z es la dirección mayor interés debido a su precarga para soportar el peso corporal. Existe un corrimiento hacia la izquierda de los resultados obtenidos en el difractograma a comparación del *PDF* de HAp sintética. Esto indica distorciones en el tamaño de la red al ser mayor gracias a las aportaciones de los iones de Ca, Mg, Na, etc., que únicamente están presentes en la HAp de origen biológico.

Debido a las pruebas mecánicas de compresión de tejido óseo en donde se hicieron variaciones de composición, dirección y posición de las muestras cúbicas se puede concluir que la dirección Z es, en términos generales, la de mayor resistencia al ser sometida a cargas de compresión.

Por lo tanto, se concluye que el hueso trabecular presenta arquitectura anisotrópica cuyas propiedades morfológicas, estructurales y mecánicas dependen de la composición antes y después de tratamientos térmicos, así como de la dirección y posición de extracción y/o análisis del tejido óseo.

Bibliografía

- [1] C. G. Helguero, J. L. Amaya, D. E. Komatsu, S. Pentyala, V. Mustahsan, E. A. Ramirez, and I. Kao, “Trabecular scaffolds’ mechanical properties of bone reconstruction using biomimetic implants,” *Procedia CIRP*, vol. 65, pp. 121 – 126, 2017. 3rd CIRP Conference on BioManufacturing.
- [2] M. J. Mirzaali, J. J. Schwiedrzik, S. Thaiwichai, J. P. Best, J. Michler, P. K. Zysset, and U. Wolfram, “Mechanical properties of cortical bone and their relationships with age, gender, composition and microindentation properties in the elderly,” *Bone*, vol. 93, pp. 196 – 211, 2016.
- [3] M. Edgar, “Pain in the well-fixed, aseptic titanium hip replacement: the role of corrosion,” *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, vol. 87, no. 5, p. 745; author reply 745—6, 2005.
- [4] R. Solar, S. Pollack, and E. Korostoff, “In vitro corrosion testing of titanium surgical implant alloys: an approach to understanding titanium release from implants,” *Journal of biomedical materials research*, vol. 13, no. 2, p. 217—250, 1979.
- [5] I. Swiatkowska, N. Martin, and A. J. Hart, “Blood titanium level as a biomarker of orthopaedic implant wear,” *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 53, pp. 120 – 128, 2019.
- [6] S. M. Londoño-Restrepo, C. F. Ramirez-Gutierrez, H. Villarraga-Gómez, and M. E. Rodriguez-García, “Chapter 14 - study of microstructural, structural, mechanical, and vibrational properties of defatted trabecular bovine bones: natural sponges,” in *Materials for Biomedical Engineering* (A.-M. Holban and A. M. Grumezescu, eds.), pp. 441 – 485, Elsevier, 2019.
- [7] S. Londoño-Restrepo, R. Jeronimo-Cruz, B. Millán-Malo, E. Rivera-Muñoz, and M. Rodriguez-Garcia, “Effect of the nano crystal size on the x-ray diffraction patterns of biogenic hydroxyapatite from human, bovine, and porcine bones,” *Scientific Reports*, vol. 9, p. 5915, 2019.
- [8] R. Huiskes, “If bone is the answer, then what is the question?,” *Journal of anatomy*, vol. 197 (Pt 2), pp. 145–56, 09 2000.

- [9] A. Giraldo-Betancur, D. Espinosa-Arbelaez, A. del Real-López, B. Millan-Malo, E. Rivera-Muñoz, E. Gutierrez-Cortez, P. Pineda-Gomez, S. Jimenez-Sandoval, and M. Rodriguez-García, “Comparison of physicochemical properties of bio and commercial hydroxyapatite,” *Current Applied Physics*, vol. 13, no. 7, pp. 1383 – 1390, 2013.
- [10] B. Clarke, “Normal bone anatomy and physiology,” *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, vol. 3 Suppl 3, pp. S131–9, 2008.
- [11] E. Seeman, “Bone quality: The material and structural basis of bone strength,” *Journal of bone and mineral metabolism*, vol. 26, pp. 1–8, 2008.
- [12] N. Eliaz and N. Metoki, “Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications,” *Materials*, vol. 10, no. 4, 2017.
- [13] R. Oftadeh, M. Perez-Viloria, J. Villa-Camacho, A. Vaziri, and A. Nazarian, “Biomechanics and mechanobiology of trabecular bone: A review,” *Journal of biomechanical engineering*, vol. 137, 2014.
- [14] T. Keaveny, E. Morgan, G. Niebur, and O. Yeh, “Biomechanics of trabecular bone,” *Annual review of biomedical engineering*, vol. 3, pp. 307–33, 2001.
- [15] S. Matsunaga, N. Takano, Y. Tamatsu, S. Abe, and Y. Ide, “Biomechanics of jaw bone considering structural properties of trabecular bone,” *Journal of Oral Biosciences*, vol. 53, no. 2, pp. 143 – 147, 2011.
- [16] M. Akram, R. Ahmed, I. Shakir, W. A. W. Ibrahim, and R. Hussain, “Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources, journal of materials science,” *Journal of Materials Science*, vol. 49, no. 4, pp. 1461–1475, 2013.
- [17] S. J. Kalita, A. Bhardwaj, and H. A. Bhatt, “Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 27, no. 3, pp. 441–449, 2007. Next Generation Biomaterials.
- [18] V. Uskokovic, “The role of hydroxyl channel in defining selected physicochemical peculiarities exhibited by hydroxyapatite,” *RSC Adv.*, vol. 5, 2015.
- [19] L. Cardoso, S. P. Fritton, G. Gailani, M. Benalla, and S. C. Cowin, “Advances in assessment of bone porosity, permeability and interstitial fluid flow,” *Journal of Biomechanics*, vol. 46, no. 2, pp. 253–265, 2013. Special Issue: Biofluid Mechanics.
- [20] J. Ltd, “Sem scanning electron microscope a to z basic knowledge for using the sem,” *Jeol Ltd*, 2009.
- [21] P. Hawkes and J. C. Spence, *Science of Microscopy*, vol. v. 12. Springer, 2007.

- [22] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principios de Análisis Instrumental*. Cengage Learning, 6^a ed., 2008.
- [23] W. Zhou, R. Apkarian, Z. L. Wang, and D. Joy, *Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM)*, pp. 1–40. New York, NY: Springer New York, 2007.
- [24] A. A. Bunaciu, E. gabriela Udriștioiu, and H. Y. Aboul-Enein, “X-ray diffraction: Instrumentation and applications,” *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 45, no. 4, pp. 289–299, 2015.
- [25] J. G. Brown, *Diffraction of X-rays*. Boston, MA: Springer US, 1966.
- [26] K. Inaba, S. Kobayashi, K. Uehara, A. Okada, S. Reddy, and T. Endo, “High resolution x-ray diffraction analyses of (La,Sr)MnO₃/ZnO/sapphire(0001) double heteroepitaxial films,” *Advances in Materials Physics and Chemistry*, vol. 3, pp. 72–89, 2013.
- [27] C. Stan, C. Beavers, M. Kunz, and N. Tamura, “X-ray diffraction under extreme conditions at the advanced light source,” *Quantum Beam Science*, vol. 2, 2018.
- [28] P. Patnaik, *Dean’s Analytical Chemistry Handbook*. McGraw-Hill Handbooks, McGraw-Hill Professional, 2 ed., 2004.
- [29] F. Leitão Muniz, M. Miranda, C. Morilla-Santos, and J. Sasaki, “The scherrer equation and the dynamical theory of x-ray diffraction,” *Acta Crystallographica Section A Foundations and Advances*, vol. 72, 05 2016.
- [30] L. Martínez Goyeneche, *Determinación del tamaño de partícula mediante difracción de rayos X*. PhD thesis, 2018.
- [31] J. Fermin, D. Salcedo, C. Durante Rincón, and J. Castro, “Análisis de tensión/tamaño en compuestos ternarios Ag_{1-x}Bi_xTe₂ (vi = s, se, te) mediante difracción de rayos-x,” *Revista Mexicana de Física*, vol. 63, pp. 345–350, 08 2017.
- [32] E. Kurkova, “Bragg’s law and diffraction: How waves reveal the atomic structure of crystals,” 2016.
- [33] W. Soboyejo, “Mechanical properties of engineered materials,” *Materials and Corrosion*, vol. 54, no. 9, pp. 712–712, 2003.
- [34] A. Nazir and J.-Y. Jeng, “Buckling behavior of additively manufactured cellular columns: Experimental and simulation validation,” *Materials Design*, vol. 186, p. 108349, 11 2019.
- [35] D. J. Green, *An Introduction to the Mechanical Properties of Ceramics (Cambridge Solid State Science Series)*. Cambridge University Press, 1st ed., 1998.

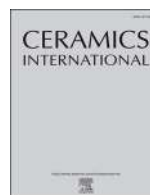
- [36] W. F. Smith and J. Hashemi, *Fundamentos de la Ciencia e Ingenieria de Materiales*. McGraw-Hill, 4 ed., 2006.
- [37] A. Castillo-Paz, S. Londoño-Restrepo, C. Ortiz-Echeverri, R. Ramirez-Bon, and M. Rodriguez-Garcia, "Physicochemical properties of 3d bovine natural scaffolds as a function of the direction," *SSRN Electronic Journal*, 01 2021.
- [38] P. Laven, "Separating diffraction from scattering: The million-dollar challenge," *Journal of Nanophotonics - J NANOPHOTONICS*, vol. 4, 03 2010.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Producción científica

A.1. Artículos en línea

1. Sandra M. Londoño-Restrepo, Mariana Herrera-Lara, Leon R. Bernal-Alvarez, Eric M. Rivera-Muñoz, Mario E. Rodríguez-García, In-situ XRD study of the crystal size transition of hydroxyapatite from swine bone, *Ceramics International*, Volume 46, Issue 15, 2020, Pages 24454-24461, ISSN 0272-8842, doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.06.2300.
2. Mariana Herrera-Lara, Carmen Robles-Barron, A Rosas-Durazo, Recubrimiento de nanohojuelas de óxido de grafeno con biopolímeros para aplicaciones biomédicas, *NTHE*, Volume 23, 2018, Pages 72-75 ISSN: 2007-9079.



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



Sandra M. Londoño-Restrepo^{a,*}, Mariana Herrera-Lara^b, Leon R. Bernal-Alvarez^b,
Eric M. Rivera-Muñoz^a, Mario E. Rodríguez-García^a

^a Departamento de Nanotecnología, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, 76230, Querétaro, Qro, Mexico

^b Ingeniería Física, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, C.P. 76010, Querétaro, Qro, Mexico

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 Na^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Si^{2+} , Ba^{2+} , F^- , and 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 (S.M. Londoño-Restrepo).

sintering temperature or heating rate. Janus et al. [15] studied the influence of heat treatment on the chemical composition and microstructure of natural hydroxyapatite from porcine pig bones by calcination in O₂ or CO₂ atmospheres at 800 and 1000 °C. The main differences reported were the formation of CaO when the sample was calcined only in O₂ atmosphere, regardless of the temperature. Moreover, crystals developed a bigger size (700–1000 nm) when the sample was calcined, first in O₂, and then in CO₂ at 1000 °C than when the sample was calcined only in O₂ (200–700 nm). Nevertheless, information concerning the physicochemical properties of the hydroxyapatite before calcination was not provided. On the other hand, Haberko et al. [16] also studied hydroxyapatite from porcine bones calcined in O₂ or CO₂ atmospheres at 1000 °C. The uncalcined sample was described as composed of hydroxyapatite, sodium, magnesium, and carbonate. In this case, they reported that CaO was found but also MgO and rhenanite (NaCaPO₄) when the sample was calcined in O₂, while an increase of the amount of carbonate was found without the formation of other phases when CO₂ was used. Figueiredo et al. [17] subjected cortical bone samples of human, bovine, and porcine bones to different calcination temperatures (600, 900, and 1200 °C) to analyze their chemical and structural properties. They concluded that the crystallinity degree and crystallite size progressively increased with the calcination temperature, contrary to porosity that strongly decreased at elevated temperatures. However, the temperature in which physicochemical changes happen was not reported either.

All of these kinds of studies do not go far enough to understand the behavior of the mineral phase of the porcine BIO-HAP during a calcination process, and this knowledge opens the door to future applications of porcine hydroxyapatite.

This work aims to study, for the first time, the *in situ* physicochemical changes that BIO-HAP obtained from swine bones experience during calcination by using high-temperature X-ray diffraction and differential scanning calorimetry. Moreover, a comparative analysis of these changes, with the morphological properties of *ex situ* obtained samples by high-resolution microscopy and studies of porosity by BET. A new interpretation of the changes in the shape of the X-ray diffraction patterns of porcine BIO-HAP based on its crystal size change during *in situ* calcination is presented in this work.

2. Materials and methods

2.1. Samples preparation

Cortical femur bones from porcine were collected from the local slaughterhouse located in Queretaro City, Mexico. Bone powder samples were cleaned, according to Londoño-Restrepo et al. [18]. In brief: Cortical bone slices were subjected to manual removal of the soft tissue and subsequent drying and pulverization until 147 μm of particle size. The bone powder was deproteinized by boiling it in a calcium hydroxide 0.05 M (1:10 ratio) solution for 30 min at high pressure (1.2 atm; 154 °C) into an All American 1915x autoclave. This process was repeated three times. After this, the bone powder was dried at 92 °C for 24 h and then subjected to a defatting process using Soxhlet equipment with petroleum ether. Finally, the bone powder was dried again at 92 °C for 24 h. This sample was labeled as P-HAP. P-HAP was also calcined in a Felisa muffle furnace (San Juan de Ocotán Zapopan, Jalisco, México) every 20 °C, from 400 to 900 °C, with a heating rate of 6 °C/min to perform the *ex situ* characterizations. Samples were cooled to room temperature by a slow furnace.

2.2. High-resolution transmission electron microscopy: HR-TEM

P-HAP was disaggregated by sonication, in isopropyl alcohol, at 40 W power and 26 kHz frequency, for 15 min, using a UP200Ht ultrasonic processor (Hielscher Ultrasonics GmbH), equipped with an S26d sonotrode. 2 μL of diluted sample was put on a copper grid coated with

carbon film and examined in an HR-TEM (JEOL ARM200F) at an accelerating voltage of 200 kV. HR-TEM images were recorded and analyzed using the Digital Micrograph software (Gatan). The array mask was applied to clean the FFT signal. Crystal size was determined using the Image J free software.

2.3. In-situ high temperature X-Ray diffraction (HT-XRD)

1 g of P-HAP was densely packed in a platinum sample holder and then analyzed using an Ultima IV-Rigaku with a temperature chamber operating at 40 kV, 30 mA with CuK_α radiation wavelength of $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$. The X-ray diffraction patterns were carried out from 5 to 80° in a 2θ scale with a step size of 0.02. Diffractograms were recorded every 20 °C during calcination of the P-HAP sample into the temperature chamber from 400 to 900 °C with heating rates of 3, 6, and 9 °C/min.

2.4. Morphological analysis: HR-SEM

Some calcined P-HAP samples into the muffle furnace (620–820 °C) were observed in a Hitachi SU8230 high resolution scanning electron microscope (HR-SEM) with 1.0 kV electron acceleration voltage in order to determine morphological changes; images were recorded at 100,000 ×. Samples were fixed on aluminum holders with alcohol-based colloidal graphite. Crystal size was determined using the Image J free software.

2.5. Differential scanning calorimetry

The calorimetric measurement of the P-HAP sample was carried out in a TGA/DSC 2 Star[®] system from Mettler Toledo. 12.0 ± 0.5 mg of sample was put into an alumina crucible and heated from room temperature to 900 °C at 6 °C/min heating rate.

2.6. Brunauer–emmett–teller BET surface area

A Micromeritics ASAP 2020 instrument was used for the adsorption isotherms of N₂ at 77.3 K to clarify the textural properties of P-HAP, as well as some selected calcined samples into muffle furnace (600–900 °C). Before measurement, the samples were at 353.15 K, and 500 μmHg for 15 h. 0.0220 g of the degassed samples were used in each adsorption experiment. The specific surface area and the pore diameter were obtained by assuming the primary particles to be spherical $D_{\text{BET}} = 6/S\rho$, where ρ is the theoretical density of pure HAP (3.156 g/cm³) and S is the specific surface area.

3. Results and discussion

3.1. P-HAP characterization

HR-TEM images of hydroxyapatite crystals provide information regarding morphology, crystal size, and porosity of the sample. Fig. 1a shows an HR-SEM image for P-HAP taken at 100,000 ×, which helped to determine that this sample is composed of cumuli of nanometric like-plates crystals around 18 nm length and 7 nm width. Fig. 1b shows an HR-TEM image for clean pig bone powder in which the high atomic arrangement is easily observed, and the interplanar distance between these atoms was calculated in Fig. 1d as 0.28 nm that corresponds to < 211 > family of directions. Finally, Fig. 1c exhibits the fast Fourier transform image for the analyzed section. The most intense points that correspond to those (211) and (004) planes that were identified using the ICDD card No. 00-009-0432. HR-TEM images manage to demonstrate that hydroxyapatite from biogenic sources like swine bones are not poorly ordered, as is commonly reported, based on X-ray diffraction patterns. Diffraction patterns with broad peaks can be originated by an amorphous phase in the sample or by the presence of nanometric

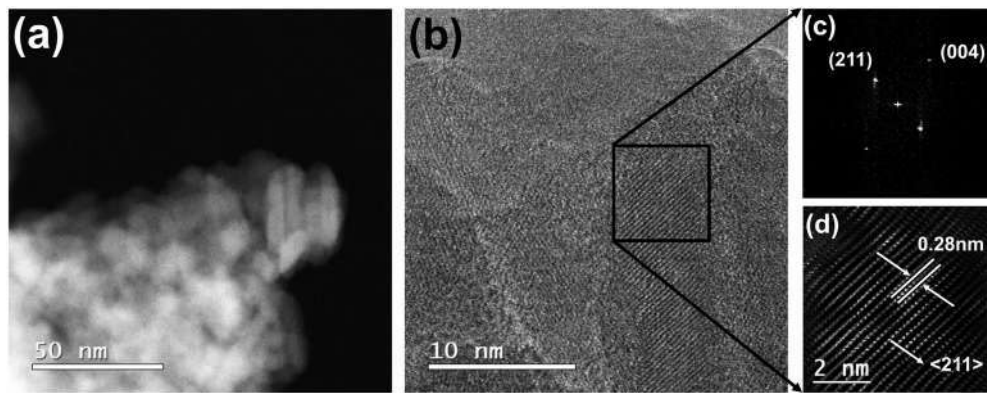


Fig. 1. (a) Dark field TEM image of P-HAp taken at $100,000\times$. (b) HR-TEM image of P-HAp. (c) FFT generated from the analyzed section of the HR-TEM image; dots were indexed as (211) and (004) planes. (d) IFFT atomic arrangement after applying the array mask.

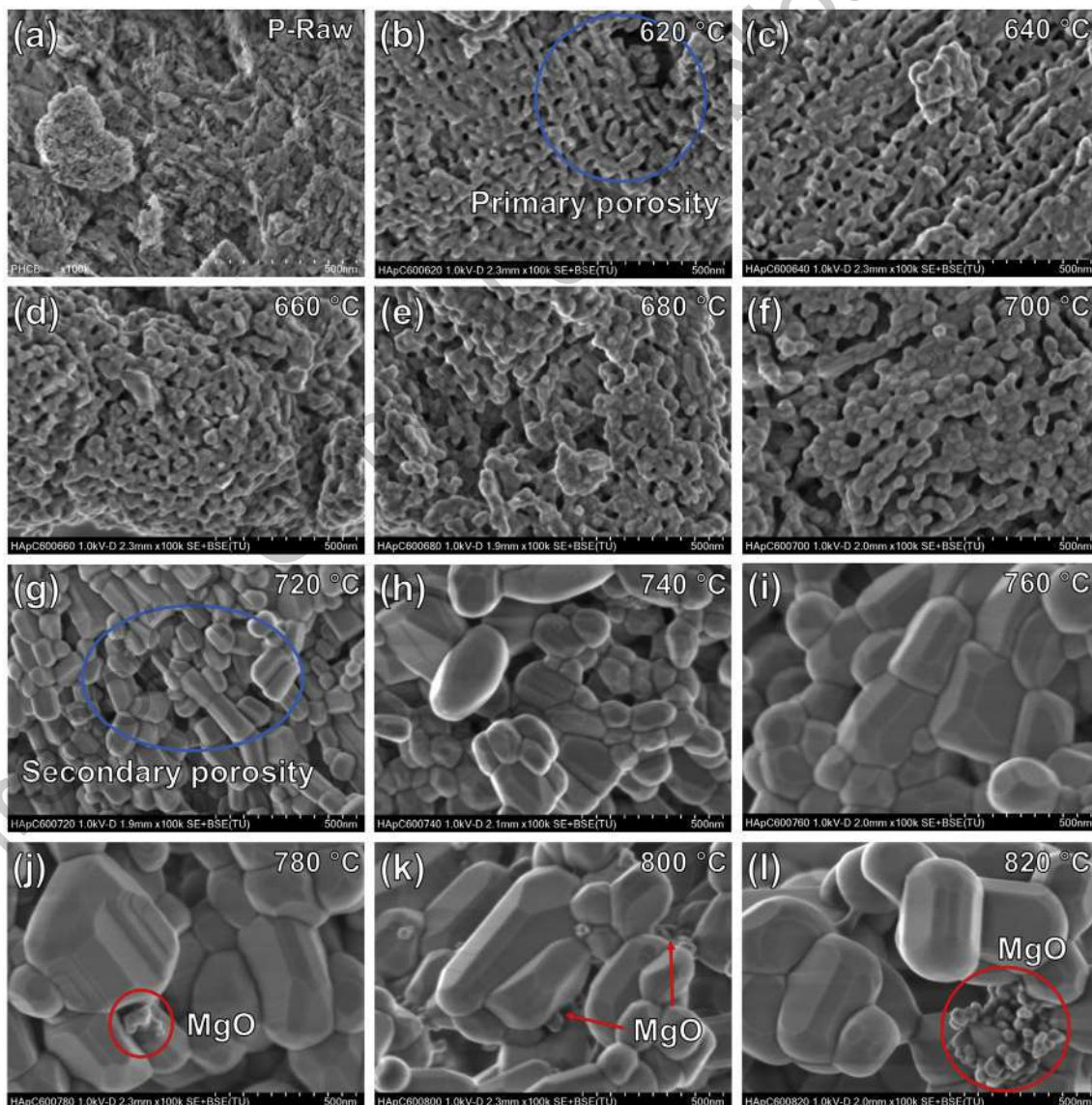


Fig. 2. HR-SEM images of (a) P-HAp. (b–l) HR-SEM images of *ex situ* calcined hydroxyapatite samples (620–820 °C; 6 °C/min).

crystals, as is the case for P-HAp.

3.2. Morphological analysis: HR-SEM

Fig. 2 shows HR-SEM images taken at $100,000\times$ of P-HAp and *ex situ* calcined samples from 620 to 820 °C. Fig. 2a for the P-HAp exhibits the existence of interconnected nanocrystals, but as can be seen from Fig. 1a, the average value for length was 18 ± 3 nm, while for width was 6.5 ± 0.5 nm, and these crystals are like-nanoplates. This sample exhibits a primary porosity originated by the percolated lattice of sites where fat and protein were; this corresponds to the intra nanocrystal porosity.

Fig. 2b shows that the sample calcined into the furnace at 620 °C is still formed by coalesced nanocrystals due to the heating temperature. The first nanocrystals have coalesced, and then, the presence of another porosity originated by the growth of crystals can be noticed, but the intra nanocrystal porosity is still present. Hydroxyapatite crystals continuously grow due to the coalescence phenomena inducing a progressive loss of the primary porosity, and it has now originated the inter nanocrystal porosity. The transition from primary (intra) to secondary (inter) porosity is more evident for the sample calcined into the furnace at 720 °C (Fig. 2g) when crystals have transitioned to micrometric crystals and the intragranular space is almost lost.

It is important to note that the coalescence produces elongate nanocrystal, which exhibits preferential crystal growth. In Fig. 2c–f (640–700 °C), the crystal size increases due to the thermal treatment, and as a result, it is expected that the secondary (inter) porosity increases as well. It is also expected that the surface area decreases due to crystal growth. Fig. 2g shows one of the most important findings of this work, and reveals that when the sample is heated at 720 °C, there is a transition of the crystal size and a morphological change that produces micro hexagonal crystals. For this sample, the concept of porosity disappears because the space between crystals depends on the crystal organization.

Fig. 2h–k confirms that the coalescence continues taking place, and as a result, the crystal size increases but now on the micro-scale. Coalescence is an important phenomenon that so far is an open problem. However, in the case of the hydroxyapatite growth, it is produced by crystalline planes parallel to the Z-direction, as can be seen in Fig. 2j, in which the layers are observed. Fig. 2j to l (780–820 °C) show the presence of small nano particles. Ramirez-Gutierrez et al. [9] reported that these particles correspond to the MgO crystalline phase. The X-ray diffraction analysis will give information about the phase identification of the samples.

Finally, it is worth noting that mammalian bones exhibit different levels of porosities that are needed for blood irrigation and vascularization [18]. Thus, hydroxyapatites from porcine bones should not be calcined above 700 °C in order to keep the own porosity of the material. The above results open a new window of application for this material for intra nano porosity produced by the interconnected nano to micro HAp particles.

3.3. In-situ X-ray analysis: HT-XRD

Fig. 3a–c shows the X-ray diffraction (XRD) pattern for P-HAp, as well as the *in situ* XRD patterns carried out every 20 °C from 400 to 900 °C, with heating rates of 3, 6, and 9 °C/min. Patterns are only present from 24 to 38° in the 2θ scale for graphical reasons, but phase identification of all samples was carried in full patterns from 5 to 80°. As was above-mentioned, P-HAp is composed of nanometric crystals; thus, its XRD pattern exhibits broad peaks due to the inelastic scattering contribution to it, generated by the nanocrystals. For this reason, the only phase that could be identified was hydroxyapatite. However, it has been reported that the mineral phase of the bone is mainly composed of hydroxyapatite, but also of calcium carbonate and other calcium phosphates [19,20]. Indeed, hydroxyapatite was the only phase that

was identified in the *in situ* XRD patterns of the heated samples using the ICDD card No. 00-009-0432 for synthetic hydroxyapatite, until 760 °C. From 780 °C, the (200) and (220) planes of MgO were found (ICDD card No. 00-004-0829) for all samples regardless of the heating rate, as was expected according to the HR-SEM images (Fig. 2j to l). The formation of this phase can be explained as an out-diffusion of the magnesium, naturally present in the bone, that is oxidized since the calcination was done in the air atmosphere. In addition, a peak located around 32.94° (*) was found after samples were heated from 800 to 900 °C for the three heating rates. However, it could not be identified because a single peak is not enough to identify a crystalline phase.

It is worth noting that XRD peaks experienced a left shift due to thermal expansion of the crystal lattice as temperature increases; this effect is easily seen for the (002) peak found at 25.74° for P-HAp (sample at room temperature), but located at 25.41° when the sample was heated at 900 °C (Fig. 3c). A vertical line was established to visualize the shift. An essential aspect of Fig. 3 is that when the samples are heated for temperatures higher than 740 °C, there is recrystallization because all crystalline directions on the patterns are revealed. This is also evident in HR-SEM images (Fig. 2h, i, and j).

Fig. 4a and b shows the change in the intensity of the (211) peak and its first derivative as a function of the temperature and the heating rate that were studied to identify the structural changes that the sample suffered during heating. This change is closely related to the internal order of the crystalline structure (see Fig. 3a–c), as can be seen in Fig. 4b, from 720 to 760 °C, there is a two steps re-crystallization revealed by the drastic increase in the peak intensity, while from 780 to 820 °C (Fig. 2j, k, and l), there is a strong decrease in the peak intensity that is related to the loss of crystallinity due to the formation of MgO and the loss of carbonates.

Fig. 4c shows the changes in the full width at the half maximum (FWHM) values for the peak located around 25.879° that corresponds to the diffraction of the (002) peak of each one of the *in situ* XRD patterns. The FWHM value for a peak is commonly used as a quality parameter for crystalline materials. High FWHM values are often related to poor crystalline quality or the presence of amorphous phases. However, as was previously demonstrated, hydroxyapatite crystals from porcine bones (P-HAp) are nanometric. According to Pinna [21], diffraction peaks become narrower when the crystal size increases, as is the case of the P-HAp during the thermal treatment, as shown by HR-SEM. It was also demonstrated by Londoño-Restrepo et al. [18] through a simulation using PDF-4 software, in which it was proved that small increments in crystallite size produce drastic changes in the shape and width of the diffraction peaks. In this way, a range of temperatures in which crystals remain nanometric is established from room temperature to 700 °C regardless of the heating rate; this, although the coalescence process is happening as can be seen in Fig. 2a–f. From 720 °C onwards, nanocrystals turn into micrometric crystals, which is, in part, the reason why the FWHM values rapidly decrease. Here, it is worth noting that while crystals remain nanometric and organic material is still present (400–700 °C), there is a floating behavior, but FWHM values keep at the top of the graph. This trend can be explained not only by the nanometric size of the crystals and the presence of fat and protein, but also by the crystalline quality of HAp crystals. Findings in Figs. 4b and 2 show that crystals growth by coalescence contributes to the decrease of the FWHM values (see Fig. 4c), but also recrystallization happening from 720 to 760 °C does it.

From a crystallographic point of view, the inelastic scattering contribution to the XRD patterns disappears when crystals become micrometric. As it was shown in Fig. 4a, the decrease in the FWHM values correlates with the increase in the peak intensity, and then, for this range of temperature, crystals for all heating rates increase their size and improve their crystalline quality by complete recrystallization. Fig. 2g, h, and i confirm the existence of crystallization of the micro HAp crystals in which the crystalline quality increases.

One of the most important aspects of any incineration process is to

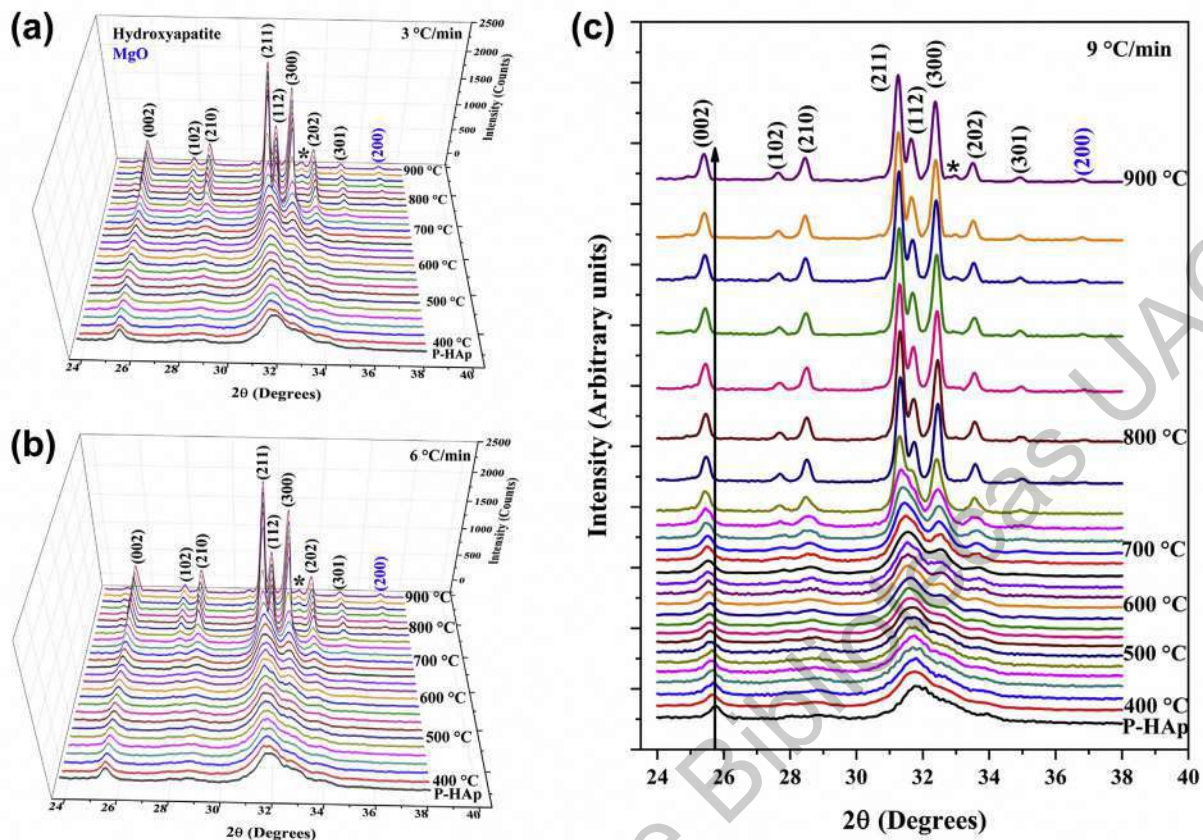


Fig. 3. *In-situ* HR-XRD patterns for P-HAp and P-HAp calcined from 400 to 900 °C each 20 °C with heating rates of (a) 3 °C/min, (b) 6 °C/min, and (c) 9 °C/min.

determine the changes in the crystal size, being Scherrer's equation and the Williamson-Hall method, the most commonly used. However, the fitting factor (around 0.9) is considered for spherical or semispherical crystals; thus, calculated values using both methods did not correlate with the experimental values obtained from HR-SEM images and findings reported by Londoño-Restrepo et al. [18] for hydroxyapatites from human, bovine and porcine bones. Fig. 4d shows the changes in length and width as a function of the temperature from the HR-SEM images. Both crystal width and length increase as the temperature does. However, there is a dramatic change of these parameters when the sample is heated above 700 °C, which confirms there is a crystal size transition from nano to microcrystals.

3.4. Differential scanning calorimetry

Fig. 5 shows the DSC thermogram and its second derivative for P-HAp taken from room temperature to 900 °C. This thermogram gives information related to endothermic and exothermic events that take place as a result of the heating process; the arrow indicates the exothermic events. The second derivative is obtained to identify thermal events more accurately. In this curve, maximums correspond to endothermic events and minimums to exothermic ones.

This work mainly focuses on the events that take place after the organic phase degradation. Endothermic peaks located at 506 and 566 °C correspond to the protein degradation in which its primary structure is broken [17]. The endothermal event between 600 and 620 °C is related to crystallization when crystals were still nanometric. Three exothermal events located at 532, 647, and 716 °C are related to the coalescence of the crystals. Coalescence is produced from an interplanar fusion that releases heat, as was evidenced in Fig. 2j. The first two events correspond to coalescence when crystals are still nanometric, while the thermal event located at 716 °C is related to the

crystal size transition of nano to microcrystals.

Together with the multiple coalescence points, there were multiple recrystallizations evidenced as endothermic events since crystals need the energy to improve their quality. These events are located at 612, 690, and 770 °C. The first two events again took place when crystals remain nanometric, but the third event corresponds to the crystallization process of microcrystals, as shown in HR-SEM images (Fig. 2h, i, and j). The *in situ* XRD patterns (Fig. 3) evidenced that crystals improved their crystallinity in that region since all the allowed diffraction planes become intense and visible (Fig. 4a). MgO formation showed in the *in situ* XRD patterns, and HR-SEM images can be seen as an endothermic event located at 796 °C. As can be seen, there is a correlation between these thermal events and the changes in the intensity and FWHM of the X-ray diffraction patterns.

3.5. Brunauer–emmett–teller BET surface area

Fig. 6a shows the average pore radius and Fig. 6b shows the surface area of P-HAp, and the *ex situ* obtained samples in the muffle furnace from 600 to 900 °C every 20 °C with a heating rate of 6 °C/min. Samples calcined into the muffle furnace certainly have differences from those ones calcined into the temperature chamber of the diffractometer since they have been cooled in the air atmosphere before characterization. Ramirez-Gutierrez et al. [22] studied the effect of the cooling rate on the physicochemical properties of bovine hydroxyapatite calcined at 940 °C and 5.5 °C/min. They used air, furnace air, water, and liquid nitrogen as cooling media, finding that when hydroxyapatite is cooled into the furnace, as is our case, crystals grow more than in the case of faster cooling. This fact carried to a more reduced porosity and an enhanced crystalline quality too. Based on this, it is clear that the cooling rate influences the pore sizes and specific surface areas (Fig. 6). However, since all of them were cooled into the muffle furnace, the

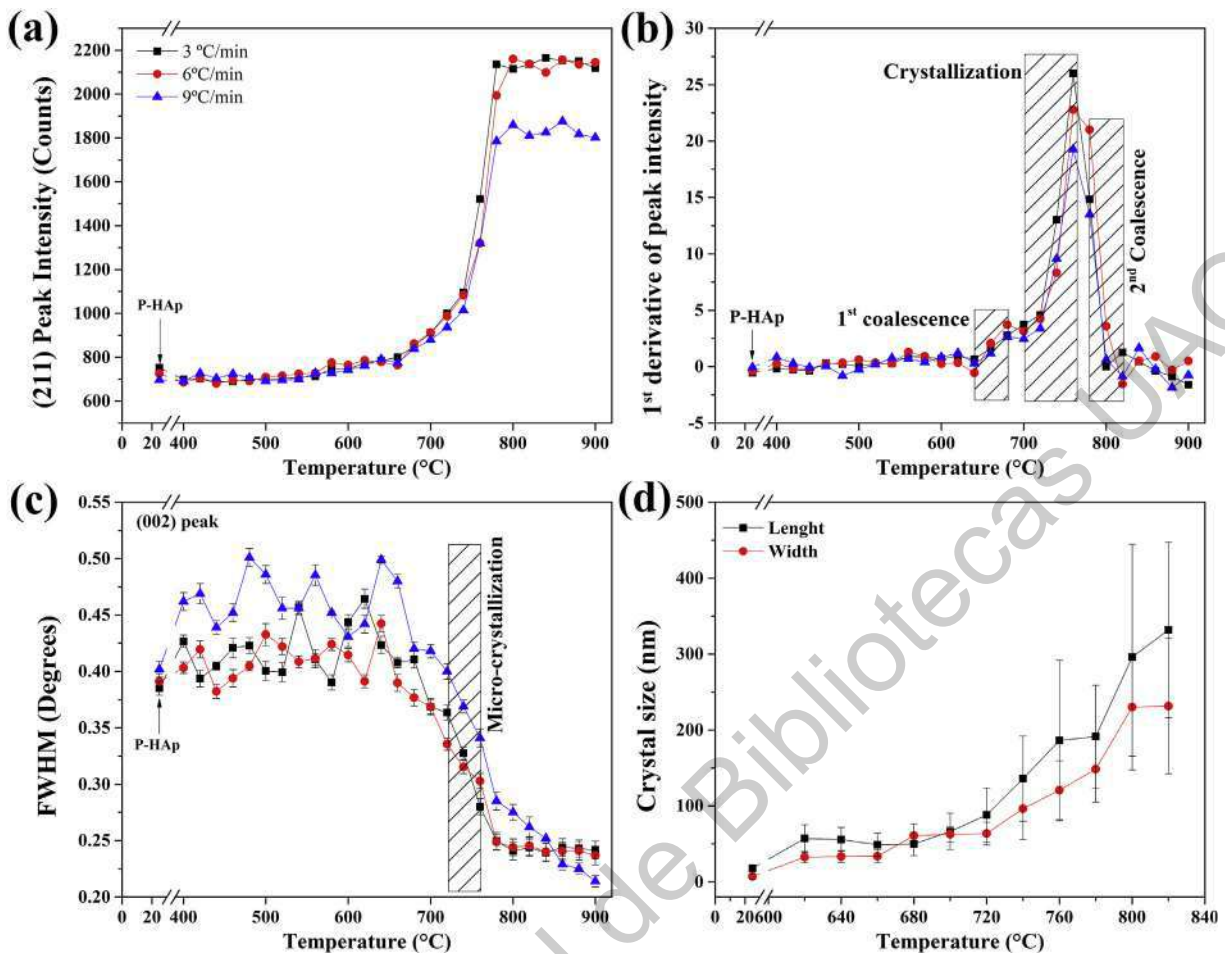


Fig. 4. (a) and (b) shows the intensity of the (211) peak and its first derivative as a function of the temperature and heating rate. (c) FWHM values of the (002) peak for all heated samples. (d) Crystal size as a function of the temperature for samples calcined at 6 °C/min into a furnace from 400 to 900 °C.

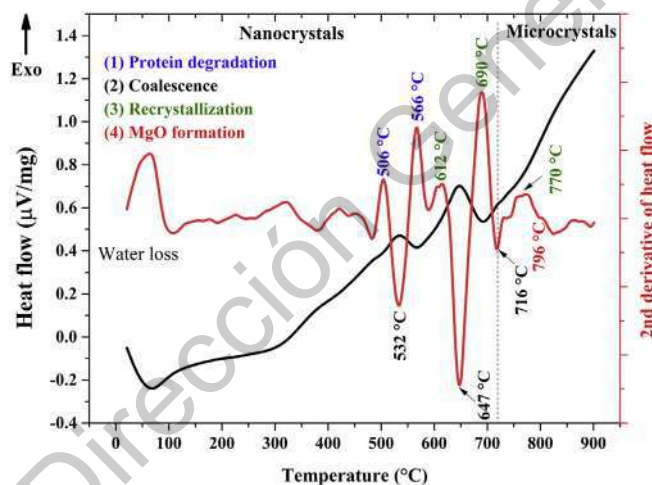


Fig. 5. DSC curve and its second derivative for the P-HAP sample.

trend that the pore size and the specific area follow, can provide useful information regarding what is happening with hydroxyapatite crystals during calcination into the diffractometer.

Fig. 6a shows that porous size increases when the samples are heated until 700 °C because of a loss of organic components from the sample, as can be seen in the DSC thermogram. However, when P-HAP is heated at 720 °C, and the crystal size transition takes place, there is a decrease in the pore radius since the intra-crystal pores are

disappearing due to the coalescence, and now, the recorded pore radius is due to the inter-crystal pores. Fig. 6b shows that the surface area for P-HAP is larger than for all samples since these are the smallest studied crystals in this work. When the sample was calcined from 600 to 700 °C, the surface area falls rapidly because of the increase in the crystal size, but crystals remain nanometric. However, when P-HAP was calcined from 720 to 900 °C, the surface area drastically decreases because crystals are micrometric now.

4. Conclusions

Hydroxyapatite from swine bones (P-HAP) is highly ordered nanometric like-plates crystals that produce broad diffraction peaks because of the simultaneous contributions of the inelastic and elastic scattering. This means BIO-HAP does not poorly exhibit crystallinity, as commonly claimed in the literature. Nanometric BIO-HAP crystals grow as temperature increases due to a coalescence process, but there is a transition from nano to micrometric crystals happening at 720 °C; this means P-HAP crystals remain nanometric until 700 °C. This transition is evidenced by a strong decrease in the FWHM of the (002) peak that comes accompanied by recrystallization, which improves the crystalline quality of the hydroxyapatite. The recrystallization is attested by a drastic increase in the peak intensity for the (211) plane, as well as the FWHM reduction. However, there is a loss of crystallinity from 780 °C since MgO formation and loss of calcium carbonate. The formation of MgO, that can be seen in HR-SEM as small spherical crystals, happens from 780 °C regardless of the heating rate.

The thermal treatments at high temperatures produce an increase of

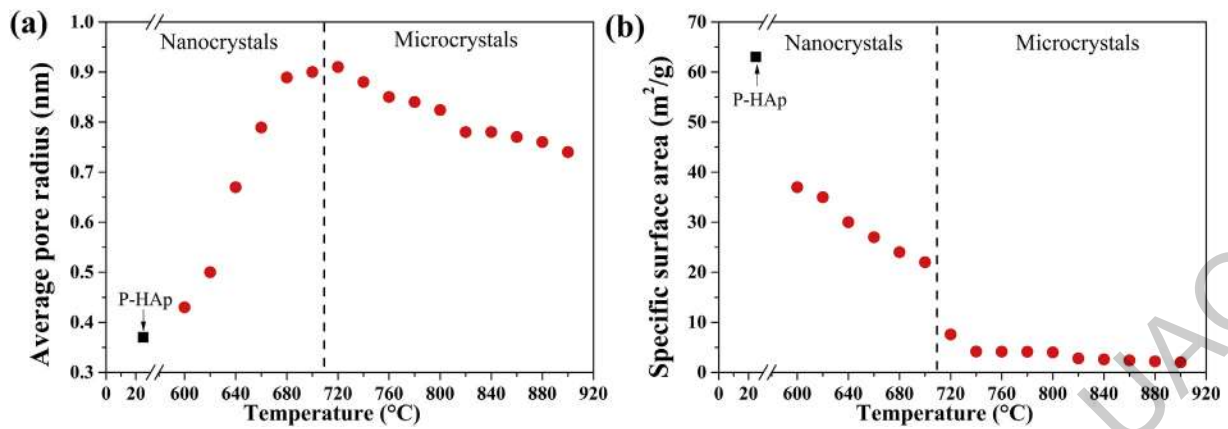


Fig. 6. (a) Average pore radius of P-HAp and calcined samples in a muffle furnace from 600 to 900 °C at 6 °C/min. (b) Specific surface area (BET) of the same samples.

the pore radius at first instance; this is due to the removal of remaining organic material since the source of this hydroxyapatite is swine bones. After 700 °C, the pore radius decreases because of the coalescence that produces the transition of the crystals from nano to micrometric size. Thus, the pore radius decreases as crystal size increases. The registered pore radius corresponds to inter microcrystals space or grain boundary when crystals get micrometric sizes and hexagonal shapes at 720 °C. Thus, the concept of porosity disappears because the space between crystals depends on the crystal organization. On the other hand, the specific surface area is continuously decreasing since P-HAp crystals are steadily growing.

Author contributions

Study conception and design: Sandra M. Londoño-Restrepo and Mario E. Rodríguez-García.

Acquisition of data: Mariana Herrera-Lara, Leon R. Bernal-Alvarez, and Eric M. Rivera-Muñoz.

Analysis and interpretation of data: Sandra M. Londoño-Restrepo and Mario E. Rodríguez-García.

Drafting of manuscript and critical revision: Sandra M. Londoño-Restrepo.

Data availability

The raw/processed data required to reproduce the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

English edition by Estefanía Rodríguez Juárez. Sandra M. Londoño-Restrepo thank to CFATA-UNAM for her postdoctoral position. This project was financed by PAPIIT (IN114320) and SEP-CONACYT Ciencia Básica (8979). The authors want to thank Dr. Daniel Bahena from Cinvestav-Zacatenco for HR-TEM images and M. en IQ. Alicia del Real from CFATA-UNAM for the technical support in HR-SEM images. This project was supported by Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales (LaNcaM) at CFATA-UNAM.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.06.230>.

References

- [1] M. Li, Q. Liu, Z. Jia, X. Xu, Y. Cheng, Y. Zheng, T. Xi, S. Wei, Graphene oxide/hydroxyapatite composite coatings fabricated by electrophoretic nanotechnology for biological applications, *Carbon* 67 (2014) 185–197, <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.09.080>.
- [2] B. Palazzo, M. Iafisco, M. Laforgia, N. Margiotta, G. Natile, C.L. Bianchi, D. Walsh, S. Mann, N. Roveri, Biomimetic hydroxyapatite-drug nanocrystals as potential bone substitutes with antitumor drug delivery properties, *Adv. Funct. Mater.* 17 (2007) 2180–2188, <https://doi.org/10.1002/adfm.200600361>.
- [3] G.A. Gholami, B. Najafi, F. Mashhadiabbas, W. Goetz, S. Najafi, Clinical, histologic and histomorphometric evaluation of socket preservation using a synthetic nanocrystalline hydroxyapatite in comparison with a bovine xenograft: a randomized clinical trial, *Clin. Oral Implants Res.* 23 (2012) 1198–1204, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02288.x>.
- [4] T.P. Cleland, D. Vashishth, Bone protein extraction without demineralization using principles from hydroxyapatite chromatography, *Anal. Biochem.* 472 (2015) 62–66, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.12.006>.
- [5] M. Gruselle, Apatites: a new family of catalysts in organic synthesis, *J. Organomet. Chem.* 793 (2015) 93–101, <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2015.01.018>.
- [6] H.L. Jaber, A.S. Hammood, N. Parvin, Synthesis and characterization of hydroxyapatite powder from natural Camelus bone, *J. Australas. Ceram. Soc.* 54 (2018) 1–10, <https://doi.org/10.1007/s41779-017-0120-0>.
- [7] M.K. Herliansyah, M. Hamdi, A. Ide-Ektesabi, M.W. Wildan, J.A. Toque, The influence of sintering temperature on the properties of compacted bovine hydroxyapatite, *Mater. Sci. Eng. C* 29 (2009) 1674–1680, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.01.007>.
- [8] S.M. Londoño-Restrepo, C.F. Ramirez-Gutierrez, A. del Real, E. Rubio-Rosas, M.E. Rodríguez-García, Study of bovine hydroxyapatite obtained by calcination at low heating rates and cooled in furnace air, *J. Mater. Sci.* 51 (2016) 4431–4441, <https://doi.org/10.1007/s10853-016-9755-4>.
- [9] C.F. Ramirez-Gutierrez, S.M. Londoño-Restrepo, A. del Real, M.A. Mondragón, M.E. Rodríguez-García, Effect of the temperature and sintering time on the thermal, structural, morphological, and vibrational properties of hydroxyapatite derived from pig bone, *Ceram. Int.* 43 (2017) 7552–7559, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.03.046>.
- [10] S.M. Londoño-Restrepo, R. Jeronimo-Cruz, E. Rubio-Rosas, M.E. Rodríguez-García, The effect of cyclic heat treatment on the physicochemical properties of bio hydroxyapatite from bovine bone, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 29 (2018) 52, <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6061-5>.
- [11] M. Akram, R. Ahmed, I. Shakir, W.A.W. Ibrahim, R. Hussain, Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources, *J. Mater. Sci.* 49 (2014) 1461–1475, <https://doi.org/10.1007/s10853-013-7864-x>.
- [12] S. Bose, G. Fielding, S. Tarafder, A. Bandyopadhyay, Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 594–605, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.06.005>.
- [13] W. Qiao, Q. Liu, Z. Li, H. Zhang, Z. Chen, Changes in physicochemical and biological properties of porcine bone derived hydroxyapatite induced by the incorporation of fluoride, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 18 (2017) 110–121, <https://doi.org/10.1080/14686996.2016.1263140>.
- [14] F.J. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Mater. Today* 14 (2011) 88–95, [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X).
- [15] A.M. Janus, M. Faryna, K. Haberko, A. Rakowska, T. Panz, Chemical and microstructural characterization of natural hydroxyapatite derived from pig bones, *Microchim. Acta* 161 (2008) 349–353, <https://doi.org/10.1007/s00604-007->

- 0864-2.
- [16] K. Haberkro, M.M. Bućko, W. Mozgawa, A. Pyda, J. Brzezińska-Miecznik, J. Carpentier, Behaviour of bone origin hydroxyapatite at elevated temperatures and in O₂ and CO₂ atmospheres, *Ceram. Int.* 35 (2009) 2537–2540, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2009.02.008>.
- [17] M. Figueiredo, A. Fernando, G. Martins, J. Freitas, F. Judas, H. Figueiredo, Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone, *Ceram. Int.* 36 (2010) 2383–2393, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2010.07.016>.
- [18] S.M. Londoño-Restrepo, R. Jeronimo-Cruz, B.M. Millán-Malo, E.M. Rivera-Muñoz, M.E. Rodríguez-García, Effect of the nano crystal size on the X-ray diffraction patterns of biogenic hydroxyapatite from human, bovine, and porcine bones, *Sci. Rep.* 9 (2019) 5915, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42269-9>.
- [19] M.J. Olszta, X. Cheng, S.S. Jee, R. Kumar, Y.Y. Kim, M.J. Kaufman, E.P. Douglas, L.B. Gower, Bone structure and formation: a new perspective, *Math. Sci. Eng. R.* 58 (2007) 77–116, <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.05.001>.
- [20] L.C. Palmer, C.J. Newcomb, S.R. Kaltz, E.D. Spoerke, S.I. Stupp, Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel, *Chem. Rev.* 108 (2008) 4754–4783, <https://doi.org/10.1021/cr800442z>.
- [21] N. Pinna, X-Ray diffraction from nanocrystals, in: F. Kremer, Leipzig, W. Richtering, Aachen (Eds.), *Progress in Colloid and Polymer Science: Scattering Methods and the Properties of Polymer Materials*, Springer, Berlin Heidelberg, 2005, pp. 29–32, <https://doi.org/10.1007/bfb0117198>.
- [22] C.F. Ramirez-Gutierrez, A.F. Palechor-Ocampo, S.M. Londoño-Restrepo, B.M. Millán-Malo, M.E. Rodríguez-García, Cooling rate effects on thermal, structural, and microstructural properties of bio-hydroxyapatite obtained from bovine bone, *J. Biomed. Mater. Res. B* 104 (2016) 339–344, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33401>.

Dirección General de Bibliotecas UAG

Recubrimiento de nano-hojuelas de óxido de grafeno con biopolímeros para aplicaciones biomédicas

Mariana Herrera Lara¹
Carmen Robles Barrón²
Aarón Rosas Durazo³

Resumen

Este trabajo se diseñó como una evaluación de las capacidades del óxido de grafeno para ser recubierto con biopolímeros biocompatibles (quitosano y κ -carragenina) de contracarga para futuras aplicaciones en medicina. Las propiedades estructurales y fisicoquímicas de óxido de grafeno, quitosano y κ -carragenina, han despertado un interés de investigación gracias a sus diversas aplicaciones en la biomedicina y nanotecnología. Cada uno de estos materiales tiene diferentes cargas que le permiten interactuar electrostáticamente; también cuentan con la capacidad de crear coloides. En el momento en que se combinan, se forma un material compuesto que tiene características distintas a las de sus componentes individuales. Puesto a que el GO, CHI y κ -Car son considerados biocompatibles, el complejo de GO/CHI/ κ -Car puede potencialmente utilizarse en productos farmacéuticos y cosméticos.

Palabras clave: óxido de grafeno, quitosano, κ -carragenina, nano-hojuelas, recubrimientos, biomédica

¹ Facultad de Ingeniería, Ingeniería Física, Universidad Autónoma de Querétaro, / marianahl_97@hotmail.com

² Biomedical Sciences, Northern Arizona University,

³ Laboratorio de Bionanotecnología, Núcleo de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico (NICDET)

Fecha de recepción:
02 de septiembre de 2018

Fecha de aceptación:
01 de octubre de 2018

Antecedentes

Óxido de grafeno (GO): material bidimensional amorfo, precursor del grafeno. En su forma de hojuelas a escala nanométrica, los grupos funcionales del GO son los principales factores que contribuyen a sus propiedades de dispersabilidad en agua y en la generación del sistema material compuesto; asimismo, se adaptan secuencialmente a aplicaciones específicas. El óxido de grafeno es un material antibacteriano y tiene capacidad de emitir fluorescencia; es un aislante eléctrico, hidrofílico, fotoluminiscente y estable, y puede ser fácilmente recubierto con polímeros (Aman, Nasional y Nasional, 2014).

Quitosano: biosintético con carga positiva derivado de la quitina; tiene propiedades antimicrobianas, es insoluble en agua y soluble en diversos ácidos. Se encuentra en conchas de crustáceos, algas, exoesqueletos de insectos, levaduras y paredes celulares de hongos. **Aplicaciones:** sistemas de administración de fármacos y plataformas de liberación controlada, complejos de administración de genes no-virales y como agente de cicatrización.

κ -Carragenina: polisacárido aniónico lineal soluble en agua e insoluble en solventes orgánicos, aceites o grasas. Es extraído de ciertas algas rojas de la clase Rhodophyceae. Tiene aplicaciones en biología, farmacéutica e industria debido a sus propiedades antioxidantes y antivirales.

Coloides: sistemas con un tamaño de partícula en el rango 10-100 nm que existen entre mezclas de dos o más componentes. Contienen una sustancia dispersada en un medio dispersante. La carga de las partículas influye en la estabilidad.

Interacciones electrostáticas: fuerzas y energías que resultan cuando un soluto posee una distribución de carga asimétrica o una carga diferente de cero.

Descripción del problema

Estudios sobre aplicaciones de nano-hojuelas de GO en aplicaciones (biomédicas y cosméticas) han sido poco reportados en la literatura, por lo que se vio la necesidad de experimentar con diferentes concentraciones de los materiales del complejo-composito para darles un uso que beneficie a la sociedad en general.

Justificación

Los materiales a utilizar son accesibles, así como de síntesis rápida y sencilla; además, cuentan con una diversidad de propiedades benéficas para el desarrollo de productos en la industria farmacéutica y cosmética.

Hipótesis

Las nano-hojuelas de óxido de grafeno serán recubiertas por capas de quitosano y κ -carragenina debido a interacciones electrostáticas entre las cargas alternadas que contiene cada uno de los materiales.

Objetivos

Generar un sistema de nano-partículas basadas en nano-hojuelas de óxido de grafeno recubiertas con los polímeros biocompatibles CHI y κ -Car, como un modelo de potencial aplicación en cosmética cutánea.

Metodología

→ CHI Low Molecular Weight (LMW) disuelto en una solución de ácido acético en agua Milli-Q, a temperatura ambiente, con agitación continua.

→ κ -Car disuelta en agua desionizada, con agitación continua, a temperatura ambiente.

→ Recubrimiento GO+CHI: se hizo la dilución de CHI en GO y, posteriormente, se ultrasonizó durante 30 min, reposó 30 min más y se centrifugó durante 1 h a 15 °C, con una velocidad de 14,500 rpm. Después de la centrifugación, se dejó en reposo 30 min, se separaron el sobrenadante y el

sedimento, y el sobrenadante quedó en reposo por 24 horas.

→ Recubrimiento (GO+CHI)+ κ -Car: la κ -Car se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Enseguida, se diluyó la mezcla de CHI + GO en la dilución de κ -Car post-agitación, se mezcló y se dejó reposar durante 1 h para análisis posterior.

Resultados y discusión

→ Espectroscopía Raman (Raman): evidencia señales de los distintos materiales, así como del complejo-composito. En la figura 1a, se presentan las dos señales inequívocas de GO. Las señales ubicadas a 1368 cm^{-1} y 1602 cm^{-1} corresponden a la banda D (C-C; vibración de estiramiento de C sp³) y a la banda G (C=C, C sp²) (Cobos, González, Fernández y Fernández, 2018; Qi, Yang, Xu, He y Men, 2017; Wang, Chen y Chen, 2014; Yadav, Rhee, Park y Hui, 2014).

Figura 1b: espectro en un área (750–1500 cm^{-1}) en la que, para la κ -Car, se pueden distinguir las señales características de la banda ubicada en ~802 cm^{-1} , perteneciente al éster de sulfato en la posición 2 de los residuos de anhidro-D-galactosa. Las dos bandas, ubicadas a ~849 cm^{-1} y ~970 cm^{-1} , son las vibraciones de los grupos –O–SO₃ de C-4 de monómero de galactosa y –C–O de monómero de galactosa, respectivamente.

Para el CHI hay una banda a ~940 cm^{-1} , correspondiente a la vibración (–C–N), además de una en ~1420 cm^{-1} , que corresponde al estiramiento –C–O del alcohol primario, y por último, una a ~1654 cm^{-1} correspondiente al estiramiento (C=O) grupo amida I.

Figura 1c: complejo GO+CHI+ κ -CAR; disminución de las intensidades de las bandas D y G de GO, debido a un probable traslape de las señales, inherente al recubrimiento de las nano-hojuelas, por medio de interacciones electrostáticas entre los grupos –C–O⁻ --- H⁺ y grupos –C=O⁻ del GO y –C–NH₂⁺ de CHI.

→ Potencial zeta (ζ), dispersión de luz dinámica (DLS) e índice de polidispersidad (PDI): en la

figura 2 se muestra el estudio de tamaño de partícula, PDI y carga para las nano-hojuelas de GO, con recubrimiento de CHI y κ -Car.

En la figura 2a, se observan los tamaños de partícula en función del radio hidrodinámico en

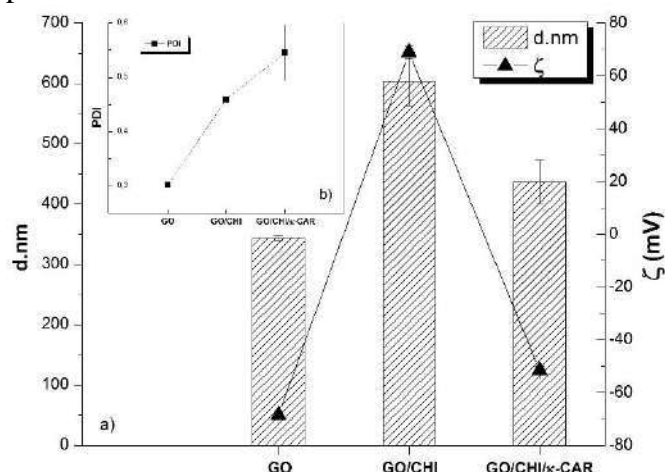


Figura 1a: tamaño de partícula y potencial Z (ζ) para nano-hojuelas de GO, recubiertas con CHI (GO/CHI) y doble capa (GO/CHI/ κ -Car). Figura 1b: índice de polidispersidad (PDI) en función del tamaño de partícula.

El PDI se encuentra en valores normales para cada etapa, lo que refleja una estabilidad de los sistemas. La confirmación de que el GO se está recubriendo por las capas de CHI y κ -Car se observa por el potencial Z registrado en cada etapa de la síntesis. Se presentan valores de carga de partícula aniónica en el caso de GO, catiónica con CHI y nuevamente una carga aniónica por recubrimiento con κ -Car; estos valores se encuentran fuera de la zona meta-estable (+/- 30 mV), por lo que se les considera sistemas estables y se confirma el recubrimiento total en cada etapa.

→ Microscopía de fuerza atómica (AFM): el estudio de la topología de los sistemas de GO (a1-a3), GO/CHI (b1-b3) y complejo-composito GO/CHI/ κ -Car (c1-c3), realizado por microscopía de fuerza atómica (AFM), evidencia tamaños de partícula acordes a los registrados por DLS. En los patrones en 3D se puede constatar, por el espesor de partícula, que el uso de ultrasonido en solvente acuoso para exfoliar el GO y obtener nano-

solvente acuoso, los cuales reflejan un crecimiento a partir del primer recubrimiento con CHI, así como, al parecer, una compactación al agregar la segunda capa del sistema con κ -Car. Aun así, permanece a un tamaño de partícula mayor al de nano-hojuela.

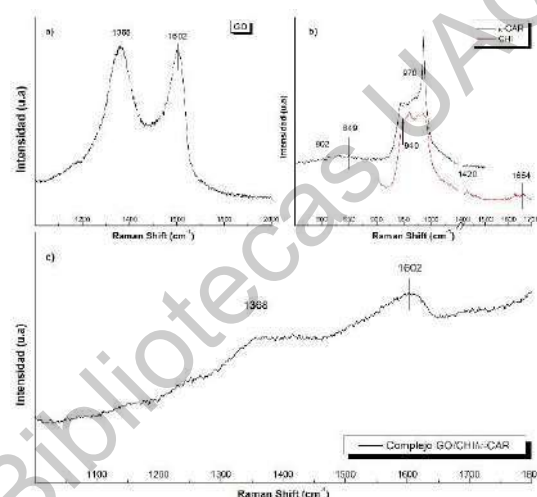


Figura. 2 Espectro Raman: a) GO; b) κ -Car (línea negra), CHI (línea roja), y c) complejo GO/CHI/ κ -Car.

hojuelas fue la metodología idónea para estandarizar un tamaño de partícula predominantemente uniforme para su estudio en las diferentes técnicas de caracterización. Se optó por manejar el sistema de nano-partículas de GO como nano-hojuelas, ya que se infiere que, si se continúa con tratamientos de ultrasonificación en solvente acuoso, el sistema seguirá exfoliándose.

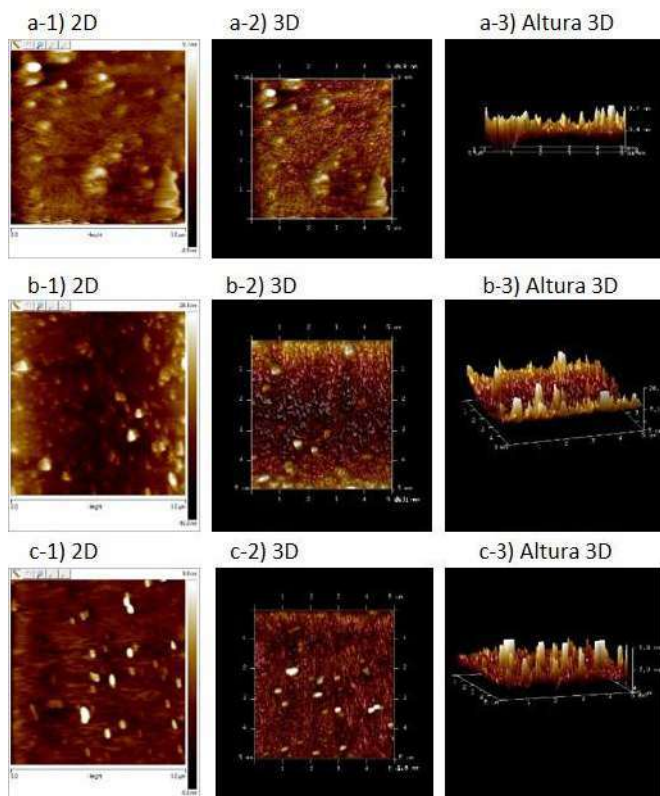


Figura 3 Imágenes de AFM de las nano-hojuelas: GO (a-1 a a-3); GO recubierto con CHI (b-1 a b-3); GO recubierto con CHI y κ Car (c-1 a c-3).

Conclusiones

Se logró desarrollar un material compuesto a base de nano-hojuelas de óxido de grafeno recubiertas por una capa de quitosano y una subsecuente de κ -Car. Asimismo, el recubrimiento de cada etapa del sistema complejo-compuesto, fue evidenciado por su carga superficial, medida con potencial Z, lo que dio como resultado valores estables. Los estudios de tamaño de partícula por DLS fueron acordes a los determinados por AFM, lo que evidenció la presencia de nano-partículas en los diversos sistemas estudiados.

Referencias bibliográficas

Aman KD, Nasional UT y Nasional UT (2014). Model, synthesis and applications of graphene oxide: a review, 3 (figure 1).

Cobos M, González B, Fernández MJ y Fernández MD (2018). Study on the effect of graphene and glycerol plasticizer on the properties of chitosan-graphene nanocomposites via in situ green chemical reduction of graphene oxide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114(2017), 599–613. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.129>

Pereira L, Gheda SF y Ribeiro-Claro PJA (2013). Analysis by vibrational spectroscopy of seaweed polysaccharides with potential use in food, pharmaceutical, and cosmetic industries. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2013(vi), 1-7. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1155/2013/537202>

Qi Y, Yang M, Xu W, He S y Men Y (2017). Natural polysaccharides-modified graphene oxide for adsorption of organic dyes from aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 486, 84-96. Disponible en línea <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.09.058>

Wang J, Chen Z y Chen B (2014). Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by graphene and graphene oxide nanosheets. *Environmental science & technology*, 48, 4817-4825. Disponible en línea: <https://doi.org/10.1021/es405227u>

Dirección General de Bibliotecas UAQ