



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería

Obtención de un material compuesto orgánico-inorgánico con porosidad controlada para su aplicación en prótesis de Tejido Óseo.

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias (Nanotecnología)

Presenta:
José Rafael Alanís Gómez

Dirigido por:
Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo

Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo
Presidente


Firma

Dr. Eric Mauricio Rivera Muñoz
Secretario


Firma

Dr. Rufino Nava Mendoza
Vocal



Firma

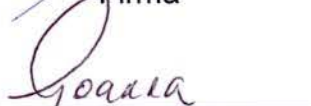
Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña
Suplente


Firma

Dra. Karen Esquivel Escalante
Suplente


Firma


Dr. Aurelio Domínguez González
Director de la Facultad


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Mayo 2015
México

RESUMEN

Los biomateriales a base de hidroxiapatita (HAp) son estudiados frecuentemente debido a la respuesta favorable que presentan al ser utilizados para la sustitución de tejido óseo. Para que la HAp pueda ser utilizada como reemplazo de tejido óseo humano es importante que tenga una morfología, tamaño y composición química similar a la que muestra estando presente en dicho tejido, obteniendo así una mayor probabilidad de aceptación por parte del organismo receptor. Además, el material de reemplazo óseo debe poseer propiedades mecánicas similares al tejido duro, como elasticidad, resistencia a la compresión y flexibilidad; de esta forma el individuo que ha recibido un implante de este tipo, podrá llevar a cabo actividades cotidianas comunes. Paralelamente, el material de reemplazo óseo debe ser lo suficientemente poroso para permitir que los fluidos y células encargadas de la regeneración del tejido óseo, puedan llevar a cabo su labor, permitiendo con ello el restablecimiento natural del hueso, y al mismo tiempo que se permita el paso de nutrientes necesarios para su funciones biológicas. El presente trabajo describe la obtención de nanoestructuras de HAp con morfología controlada a través de la síntesis hidrotérmal asistida por microondas, las nanoestructuras obtenidas son sometidas a un proceso denominado gelcasting modificado con el cual se producirá una cerámica con porosidad controlada, misma que será utilizada para la elaboración posterior de un biomaterial compuesto al difundir una fase orgánica en el interior de la estructura cerámica porosa. Ambas fases generarán un material compuesto con propiedades mecánicas sinérgicas, con la elasticidad, flexibilidad y resistencia requeridas. Las muestras se analizaron por medio de difracción de rayos X de polvos (XRD), espectroscopia de dispersión de energía (EDS), fluorescencia de rayos X, microscopía electrónica de barrido de (SEM), microscopía de transmisión de alta resolución (TEM) y adsorción y desorción de nitrógeno. Así mismo a las muestras de material compuesto se les efectuó un estudio de su resistencia a la compresión por medio de una máquina universal de pruebas mecánicas.

(Palabras clave: Biomaterial, hidroxiapatita, gel casting modificado, nanotecnología)

SUMMARY

Hydroxyapatite (HAp) based biomaterials are frequently studied due to their favorable response when used for bone tissue substitution. For HAp to be used as a replacement for human bone tissue there must be a morphology, size and chemical composition similar to that shown when it is present in the tissue, thus obtaining a greater probability of acceptance on the part of the host. In addition, the bone replacement material should have mechanical properties which are similar to hard tissue, such as elasticity, resistance to compression and flexibility. In this way, the individual receiving an implant of this type will be able to perform common daily activities. At the same time, the bone replacement material should be porous enough to allow fluids and cells responsible for bone tissue regeneration to carry out their work, thereby making possible natural bone restoration and allowing the passage of the nutrients necessary for biological functions. This study describes the preparation of HAp nanostructures with controlled morphology through microwave assisted hydrothermal synthesis. The nanostructures obtained are submitted to a process called modified gelcasting with which a ceramic with controlled porosity will be produced. The latter will be used for the subsequent preparation of a composite biomaterial by introducing an organic phase into the interior of the porous ceramic structure. Both phases will generate a composite material with synergistic mechanical properties having the elasticity, flexibility and resistance required. The samples were analyzed by X-ray diffraction (XRD), energy dispersive spectroscopy (EDS), X-ray fluorescence, scanning electron microscopy (SEM), high resolution transmission electron microscopy (TEM) and adsorption and desorption of nitrogen. The composite material samples were studied for their resistance to compression using a universal mechanical testing machine.

(Key words: biomaterial, hydroxyapatite, modified gelcasting, nanotechnology)



SECRETARÍA
ACADÉMICA

Esta tesis está dedicada a Ian, mi bebé, que es mi todo y que me
motiva a seguir esforzándome

A nan, mi amor, mi compañera, mi amiga que me impulsa a hacer
cosas que no creí poder hacer

A mis padres, por darme las herramientas para ser quien soy, y por
el cariño que me dan que me permiten ser feliz

A mis hermanos, con quien comparto grandes alegrías, gracias por
ser mis compañeros en este viaje

A mis familiares y amigos, gracias por ser parte de mí, están siempre
en mi mente

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Dr. Rodrigo Velázquez Castillo, que me guío, aconsejó, instruyó y ayudó durante toda mi etapa de posgrado.

Al Dr. Rufino Nava Mendoza, mi coordinador de maestría, gracias por su tiempo y sus puntos de vista que fortalecieron esta tesis.

A mi comité tutorial (Dr. Rodrigo, Dr. Eric, Dr. Rufino, Dr. Elizalde y Dra. Karen) por todo su tiempo, sabiduría y comentarios

A mis maestros de posgrado el Dr. Rodrigo, el Dr. Rufino, la Dra. Angeles, el M. en C. Oswaldo, la Dra. Janet, la Dra. Lucero y el Dr. Alfonso por sus valiosas enseñanzas.

Al M. en C. José Luis Cabrera Torres por su tiempo y su experiencia en los análisis de Microscopía Electrónica de Barrido y Espectroscopía de Dispersión de Energía.

Al Dr. Walter Noé Velázquez Arjona por su apoyo con la caracterización de Fluorescencia de Rayos X.

Al Dr. Jesús Arenas Alatorre por su valiosa ayuda en la obtención de las imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución.

A la M en C. Abigail Moreno Martell por su apoyo en la medición de porosidad por medio del método de adsorción y desorción de nitrógeno.

A Luis, Abraham, Néstor, Susana y Salomón que ayudaron en la parte experimental.

Y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al fondo salud CONACyT-IMSS-ISSSTE-SSA 2013-1 No 201329 por su apoyo económico.

Tabla de contenido

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 11 |
| 1.1 BIOMATERIAL | 11 |
| 1.2 MATERIAL COMPUESTO | 12 |
| 1.3 TEJIDO ÓSEO..... | 13 |
| 1.3.1. FASE INORGÁNICA | 17 |
| 1.3.2. FASE ORGÁNICA..... | 22 |
| 1.4 ANTECEDENTES | 24 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 29 |
| 2.1 HIPÓTESIS..... | 29 |
| 2.2 OBJETIVO GENERAL:..... | 29 |
| 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: | 29 |
| 3. METODOLOGÍA | 31 |
| 3.1 SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA..... | 31 |
| 3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE HAP | 33 |
| 3.2.1. DIFRACCIÓN DE RAYOS X POR POLVOS | 33 |
| 3.2.2. ESPECTROSCOPIA DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA (EDS) | 34 |
| 3.2.3. FLUORESCENCIA DE RAYOS X (XRF)..... | 36 |
| 3.2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) | 37 |
| 3.2.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)..... | 38 |
| 3.3 MÉTODO DE GEL CASTING MODIFICADO..... | 39 |
| 3.4 CARACTERIZACIÓN DEL GEL CASTING MODIFICADO | 44 |
| 3.4.1. ADSORCIÓN Y DESORCIÓN DE NITRÓGENO | 44 |
| 3.4.2. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)..... | 46 |
| 3.4.3. PRUEBAS MECÁNICAS | 46 |
| 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 49 |
| 4.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS X POR POLVOS (XRD)..... | 49 |
| 4.2 ESPECTROSCOPIA DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA (EDS)..... | 51 |
| 4.3 FLUORESCENCIA DE RAYOS X (XRF) | 53 |
| 4.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)..... | 54 |
| 4.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM) | 55 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.6 | ADSORCIÓN Y DESORCIÓN DE NITRÓGENO | 58 |
| 4.7 | CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) | 60 |
| 4.8 | PRUEBAS MECÁNICAS..... | 61 |
| 5. | CONCLUSIONES | 65 |
| 6. | REFERENCIAS..... | 66 |
| 7. | ANEXO | 70 |
| 7.1 | CALENTAMIENTO POR MICROONDAS | 70 |
| 7.2 | PREPARACIÓN DE LOS VIALES | 70 |
| 7.3 | FUNCIONAMIENTO DEL DIFRACTOMETRO | 72 |
| 7.4 | PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS POR EDS..... | 73 |
| 7.5 | PRINCIPIO FÍSICO DE LA FLUORESCENCIA DE RAYOS X..... | 73 |
| 7.6 | FUNCIONAMIENTO DEL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN | 74 |

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla

| | | |
|-----|---|----|
| 1-1 | Porcentaje en peso y volumen de los componentes de la matriz ósea. | 16 |
| 1-2 | Tabla comparativa del esmalte dental, dentina, hueso e hidroxiapatita sintética | 17 |
| 1-3 | Técnicas de preparación de hidroxiapatita..... | 21 |
| 1-4 | Composición porcentual de aminoácidos en colágeno tipo I..... | 24 |
| 4-1 | Tabla Comparativa de Esfuerzos Máximos..... | 64 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

| | | |
|-----|--|----|
| 1.1 | Estructura de un hueso largo típico..... | 13 |
| 1.2 | Representación esquemática de las células asociadas con el hueso | 14 |
| 1.3 | Gráfica de distribución de los componentes del tejido óseo..... | 16 |
| 1.4 | Estructura del Calcio tipo 1 y Calcio tipo 2. | 18 |
| 1.5 | Estructura del fosfato y el hidróxido..... | 19 |
| 1.6 | Simulación grafica de la hidroxiapatita. | 19 |
| 1.7 | Interacción del calcio tipo 2 con el grupo OH y los grupos PO_4^{-3} | 20 |
| 1.8 | Colágeno Tipo 1. | 23 |
| 3.1 | Microondas Synthos 3000 con rotor XQ-80..... | 31 |
| 3.2 | Vial de Cuarzo con chaqueta para rotor XQ-80..... | 32 |
| 3.3 | Hidroxiapatita sintetizada por el metodo hidrotermal asistido por microondas | 33 |

| | | |
|------|--|----|
| 3.4 | Difractometro de Rayos X por polvos | 34 |
| 3.5 | Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6390L..... | 35 |
| 3.6 | Equipo para fluorescencia de Rayos X..... | 37 |
| 3.7 | Esquema de un microscopio electrónico de barrido..... | 38 |
| 3.8 | Microscopio electrónico de transmisión..... | 39 |
| 3.9 | Diagrama del Gel Casting Modificado | 40 |
| 3.10 | Piezas de HAp obtenidas después del Gel Casting Modificado | 41 |
| 3.11 | Grafica de tratamiento térmico a las piezas de HAp | 42 |
| 3.12 | HAp después del Gel casting y sinterizada | 42 |
| 3.13 | Material compuesto orgánico-inorgánico..... | 43 |
| 3.14 | Quantachrome iQ2 | 46 |
| 3.15 | Zwick/Roell Z005..... | 48 |
| 4.1 | Difractograma de HAp con crecimiento cristalino aleatorio | 49 |
| 4.2 | Difractograma típico de la HAp obtenido mostrando la identificación con el PDF correspondiente..... | 50 |
| 4.3 | Difractograma indizado de la HAp obtenida a través del método hidrotermal asistido por microondas. | 51 |
| 4.4 | Espectro de EDS y tabla de porcentajes con relación calcio/fosforo de la HAp. | 52 |
| 4.5 | Espectro típico de un análisis de fluorescencia de Rayos X (XRF) a una muestra de HAp, presentándose las diferentes señales de los elementos presentes. En adición, se incluye una tabla de porcentajes de peso, atómico y relación Ca/P | 53 |

| | | |
|------|---|----|
| 4.6 | Micrografía de SEM a la síntesis de HAp..... | 54 |
| 4.7 | Micrografía de SEM de las nanofibras de HAp que permite observar su diámetro y su extremo final. Además, el recuadro de la parte inferior de la imagen muestra su perfil transversal hexagonal..... | 55 |
| 4.8 | Micrografía de HRTEM de una nanofibra de HAp en donde se muestra el ordenamiento cristalino. El recuadro superior derecho es una FFT de la región de la imagen izquierda dentro del recuadro y la imagen inferior derecha, es el resultado de la aplicación de una máscara..... | 57 |
| 4.9 | Micrografía de HRTEM de una nanofibra de HAp mostrando su ordenamiento cristalino. En el recuadro superior se presenta la FFT y debajo, la imagen generada únicamente con los planos (100)..... | 58 |
| 4.10 | Isoterma del gel casting modificado..... | 59 |
| 4.11 | Distribución de tamaño de poro..... | 60 |
| 4.12 | Calorimetría diferencial de barrido..... | 61 |
| 4.13 | Curva esfuerzo-deformación a compresión para una espuma polimérica.... | 62 |
| 4.14 | Esquema del comportamiento del material compuesto HAp-grenetina..... | 62 |
| 4.15 | Grafica de esfuerzo-deformación..... | 63 |
| 7.1 | Vial de cuarzo..... | 71 |
| 7.2 | Tapa del vial..... | 71 |
| 7.3 | Dispositivo para el sellado del vial..... | 71 |
| 7.4 | Ley de Bragg..... | 72 |
| 7.5 | Diagrama de análisis por EDS..... | 73 |
| 7.6 | Esquema de un microscopio electrónico de transmisión..... | 76 |

1. INTRODUCCIÓN

Las nanoestructuras tienen un gran interés científico debido a sus buenas propiedades físicas y químicas, mismas que se definen por las características que poseen los átomos o moléculas del interior del volumen más las propiedades de los átomos o moléculas de la superficie. Para un material macroscópico hay un número de átomos de volumen mucho mayor que el número de átomos de superficie, pero en el caso de una nanoestructura, esta relación cambia y el número de átomos o moléculas del exterior comienza a predominar y a establecer las propiedades del material.

Para el caso de las nanoestructuras de hidroxiapatita (HAp) que es parte de la propuesta a sintetizar, son de gran relevancia las propiedades mecánicas, tanto las propiedades de resistencia a la compresión, tensión y flexión como la dureza. La HAp como es ya del conocimiento general es el principal componente mineral de los huesos y dientes en los humanos.

Para una mejor comprensión de la presente investigación es preciso definir lo que es un biomaterial, un material compuesto y los componentes y las funciones del tejido óseo.

1.1 Biomaterial

Existen muchas formas para definir un biomaterial; una de ellas fue propuesta durante el “6th Annual International Biomaterials Symposium” en 1974 (*Park, J.B.*): “un biomaterial es una sustancia sistémica y farmacológicamente inerte diseñada para la implantación dentro, o incorporación a, un sistema vivo”.

La primera parte de esta definición está relacionada con la biocompatibilidad o actividad de los materiales en el ser vivo, y la segunda con las funciones particulares que dicho material desempeñará.

La palabra biomaterial se refiere, pues, a implantes que reemplazan o restablecen tejidos vivos y sus funciones.

La “biocompatibilidad” de un biomaterial se define como la habilidad de éste para cumplir satisfactoriamente una aplicación definida, con una respuesta apropiada del huésped (Hench, 1991).

Esto es, que la biocompatibilidad significa que un material no sea dañino dentro del cuerpo, pues se incluyen además las interacciones locales del material y del tejido circundante en ambas direcciones: es de vital importancia el efecto tanto del material sobre el tejido como de éste sobre el primero.

1.2 Material Compuesto

Reciben el nombre de materiales compuestos aquellos materiales que se forman por la unión de dos materiales para conseguir la combinación de propiedades que no es posible obtener en los materiales originales. Estos compuestos pueden seleccionarse para lograr combinaciones poco usuales de rigidez, resistencia, peso, rendimiento a alta temperatura, resistencia a la corrosión, dureza o conductividad (Askeland D.R. y Phulé, 2001).

Los materiales son compuestos cuando cumplen las siguientes características:

- a) Están formados de 2 o más componentes distinguibles físicamente y separables mecánicamente.
- b) Presentan varias fases químicamente distintas, completamente insolubles entre sí y separadas por una interfase.
- c) Sus propiedades son superiores a la simple suma de las propiedades de sus componentes (sinergia).
- d) No pertenecen a los materiales compuestos, aquellos materiales polifásicos; como las aleaciones metálicas, en las que mediante un tratamiento térmico se cambian la composición de las fases presentes.

1.3 Tejido Óseo

El tejido óseo es un tejido conjuntivo que se caracteriza por tener una matriz extracelular mineralizada. La característica que distingue el tejido óseo de los otros tejidos conjuntivos es la mineralización de su matriz, que produce un tejido muy duro capaz de proveer sostén y protección. El mineral es fosfato de calcio en la forma de cristales de hidroxapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).

Al examinar la superficie de corte de un hueso se pueden identificar dos organizaciones estructurales distintas del tejido óseo. Una capa densa y compacta forma la superficie ósea externa (tejido óseo compacto) mientras que una malla de aspecto esponjoso compuesta por trabéculas (delgadas espículas de tejido óseo anastomosadas (Interconectadas o unidas de forma repetitiva a modo de red)) forma parte del interior del hueso (tejido óseo esponjoso). Los espacios que hay en la malla están comunicados, y contienen la medula y los vasos sanguíneos (Figura 1.1) (Ross y Pawlina, 2013).

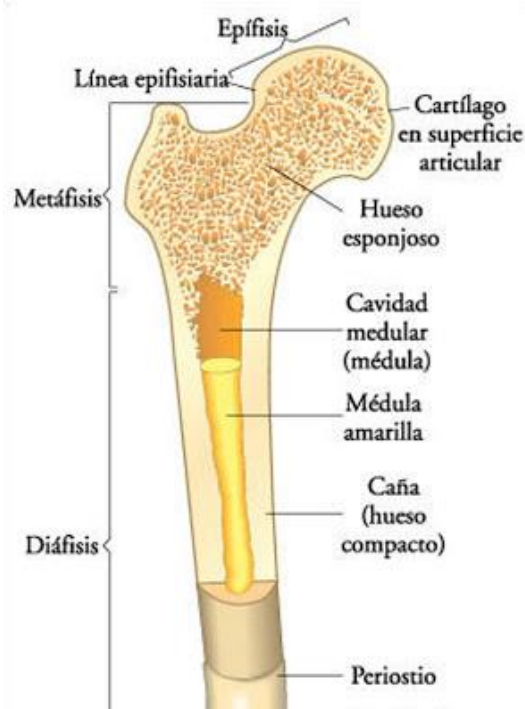


Figura 1.1 Estructura de un hueso largo típico.

El hueso tiene una notable combinación de propiedades físicas: alta resistencia a la tracción y a la compresión, mientras que al mismo tiempo tiene cierta elasticidad y la ventaja de ser un material relativamente ligero. A todos los niveles de organización de los huesos, desde su forma macroscópica hasta su estructura submicroscópica, el modo de estar constituidos les asegura la máxima resistencia con la mayor economía del material y el peso mínimo. A pesar de su fuerza y dureza el hueso es un material vivo y dinámico que está siendo renovado continuamente y que experimenta una permanente reconstrucción durante la vida del individuo (Fawcett, 1995).

En la matriz ósea hay espacios llamados osteoplastos, en los cuales interactúan la célula osteoprogenitora que es una célula en reposo que puede transformarse en un osteoblasto y secretar matriz ósea, el osteoblasto es la célula osteoformadora diferenciada que secreta matriz ósea, el osteocito que es la célula madura y está encerrado en la matriz ósea que secreto antes como osteoblasto y los osteoclastos que son células de resorción ósea presentes en superficies óseas en las que el hueso se está eliminando o remodelando (reorganizando) o donde el hueso ha sido lesionado (Figura 1.2) (Ross y Pawlina, 2013).

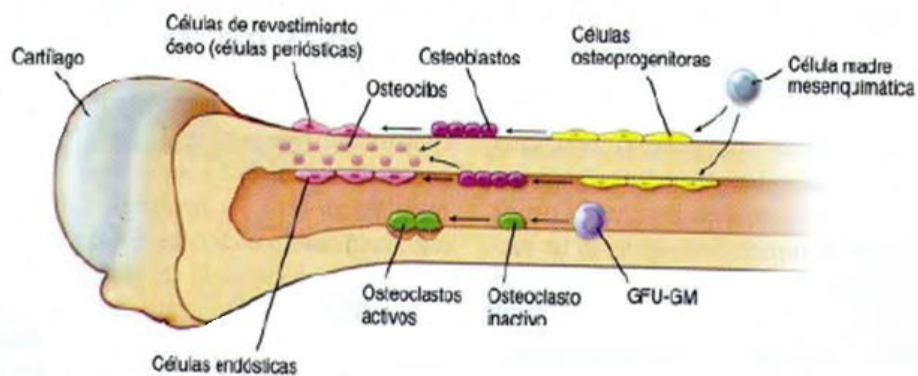


Figura 1.2 Representación esquemática de las células asociadas con el hueso (Ross y Pawlina 2013).

Desde el punto de vista de la Ciencia e ingeniería de Materiales, el tejido óseo es considerado un biomaterial compuesto orgánico-inorgánico. La estructura del tejido óseo varía dependiendo de su localización en el cuerpo. La selección del biomaterial apropiado depende del sitio anatómico en el cual se requiera el implante.

El hueso debe ser capaz de desempeñar las siguientes funciones básicas (Tortora y Derrickson, 2006):

1. Sostén. El esqueleto es la estructura del organismo que da sostén a los tejidos blandos y provee los puntos de inserción para los tendones de la mayoría de los músculos esqueléticos.
2. Protección. El esqueleto protege de las lesiones a los órganos internos más importantes.
3. Asistencia en el movimiento. La mayoría de los músculos esqueléticos se fija a los huesos; cuando se contraen, traccionan de éstos para producir el movimiento.
4. Homeostasis mineral. El tejido óseo almacena diversos minerales, especialmente calcio y fósforo, lo cual contribuye a la solidez del hueso. Los huesos liberan hacia la sangre los minerales necesarios para mantener su equilibrio (homeostasis) y distribuirlos a otras partes del organismo.
5. Producción de células sanguíneas. Dentro de algunos huesos, un tejido conectivo denominado médula ósea roja produce glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, proceso llamado hemopoyesis. La médula ósea roja consta de células sanguíneas en desarrollo, adipocitos, fibroblastos, y macrófagos dentro de un tejido de sostén (estroma) formado por fibras reticulares.
6. Almacenamiento de triglicéridos. La médula ósea amarilla está constituida principalmente por adipocitos, los cuales almacenan triglicéridos. Éstos son una reserva potencial de energía química.

El tejido óseo está compuesto por una fase mineral que ocupa un 69% de su peso total, un 9% de agua y un 22% de una matriz orgánica, la cual se compone, a su vez, básicamente de colágeno (90-96%) (Figura 1.3) (Park J. B., 2008) a continuación se muestra una tabla que desglosa el porcentaje en peso y volumen de los componentes de la matriz ósea (Tabla 1-1).

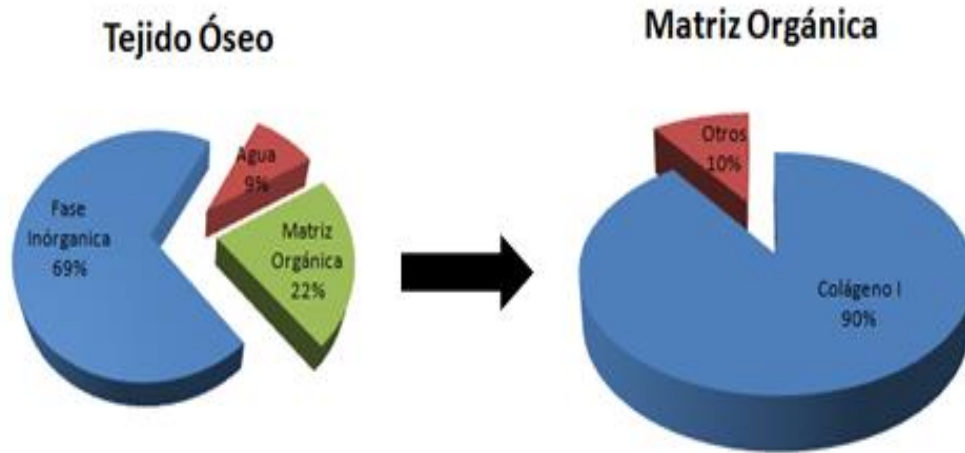


Figura 1.3 Gráfica de distribución de los componentes del tejido óseo.

Tabla 1-1 Porcentaje en peso y volumen de los componentes de la matriz ósea (Campa, et al., 2007).

| Componente | | % en Peso | % en Volumen |
|------------|--|-----------|--------------|
| Mineral | Hidroxiapatita Carbonatada, $\text{Ca}_7(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ ($\approx 80\%$) | 70 | 45 |
| | Carbonatos de Calcio ($\approx 15\%$) | | |
| | Otras Sales Minerales ($\approx 5\%$) | | |
| Orgánico | Colágena Tipo 1 ($\approx 90\%$) | 20 | 33 |
| | Glicoproteínas | | |
| | Fosfoproteínas | | |
| | Proteoglicanos | | |
| | Osteonectina | | |
| | Osteocalcina | | |
| | Osteopontina | | |
| | Proteína Morfogénica Ósea | | |
| Agua | Agua | 10 | 22 |

1.3.1. Fase Inorgánica

La fase inorgánica está conformada por una forma cristalina del fosfato de calcio, la HAp. Los cristales (nanofibras) tienen una dimensión de unos 3 nm de espesor por 60 nm de largo (Geneser, 2000), se disponen en paralelo, en relación estrecha con las fibras de colágeno. Estos cristales de HAp están ordenados sobre colágeno tipo I, mientras que la superficie libre de estos cristales está rodeada de sustancia amorfa fundamental. Atrae agua y forma una superficie hidratada, la cual permite intercambio de iones con el líquido extracelular (Fortoul, 2013).

Otras fases minerales presentes en el hueso son el fosfato dicálcico ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), el fosfato de calcio dibásico (DCP, CaHPO_4), el fosfato tricálcico (TCP; $\text{Ca}_3(\text{PO})_2$) y algunas fases amorfas de fosfatos de calcio. Existen además otros iones como el citrato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{4-}$) el carbonato (CO_3^{2-}), fluoruro (F^-) y también iones hidroxilo (OH^-), los cuales pueden dar lugar a sutiles diferencias microestructurales en el tejido óseo. Finalmente, también se encuentran algunas impurezas tales como magnesio y sodio, con trazas de cloro y hierro (Campa, *et. al*, 2007) (Tabla 1-2).

Tabla 1-2 Tabla comparativa del esmalte dental, dentina, hueso e hidroxiapatita sintética

| Elemento (% en peso) | Esmalte dental | Dentina | Hueso | Hidroxiapatita sintética |
|-------------------------|-------------------|---------|-------|-----------------------------|
| Calcio | 36.1 | 35.0 | 35.5 | 39.0 |
| Fósforo | 17.3 | 17.1 | 17.1 | 18.5 |
| Dióxido de carbono | 3.0 | 4.0 | 4.4 | - |
| Magnesio | 0.5 | 1.2 | 0.9 | - |
| Sodio | 0.2 | 0.2 | 1.1 | - |
| Potasio | 0.1 | 0.07 | 0.1 | - |
| Cloro | 0.3 | 0.03 | 0.1 | - |
| Flúor | 0.016 | 0.017 | 0.02 | - |
| Azufre | 0.1 | 0.2 | 0.6 | - |
| Zinc | 0.016 | 0.018 | - | - |
| Silicio | 0.003 | - | 0.04 | - |
| Relación Atómica Ca/P | 1.62 | 1.59 | 1.71 | 1.667 |
| Índice de cristalinidad | 70-75 | 33-37 | 33-37 | 80-100 |

La HAp sintética existe en dos formas estructurales: hexagonal y monoclinica, las cuales tienen insignificantes diferencias estructurales. La HAp hexagonal es usualmente formada por la precipitación de soluciones supersaturadas a 25°C – 100°C y la HAp monoclinica es primeramente formada a partir de la estructura cristalina hexagonal al someterse a altas temperaturas (850 °C) en aire y entonces enfriada a temperatura ambiente (Campa, *et. al*, 2007).

La HAp, cuya fórmula química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, tiene una composición, en peso, teórica de 39.68% Ca, 18.45% P, una relación en peso Ca/P de 2.151 y una relación atómica de 1.667. Ligeros desequilibrios en la relación Ca/P dan lugar a la aparición de otras fases. Si la relación Ca/P es menor que 1.67, el fosfato tricálcico alfa o beta puede estar presente. Si, por el contrario, la relación es mayor de 1.67, óxido de calcio puede aparecer. Estas fases extras pueden afectar la respuesta biológica de un implante (Best S., 2008).

A fin de distinguir los diferentes componentes estructurales en la hidroxiapatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, es conveniente reescribir su fórmula química como: $\text{Ca}(1)_2\text{Ca}(2)_3(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Donde se ha usado la notación Ca(1) y Ca(2) para indicar átomos de calcio tipo 1 y tipo 2 respectivamente. Esta división del calcio en dos tipos se debe a que se encuentran rodeados por un número distinto de oxígenos en la estructura de la apatita (Figura 1.4) (Campa, *et. al*, 2007).

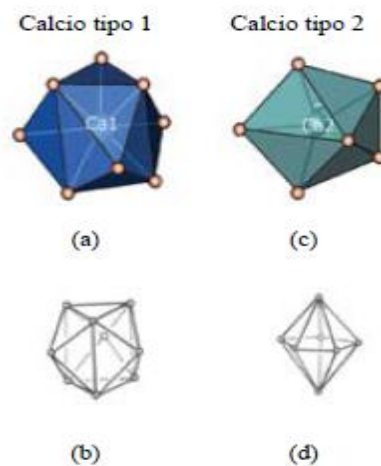


Figura 1.4 Estructura del Calcio tipo 1 y Calcio tipo 2. (Campa, *et. al*, 2007).

Se observa en la figura anterior (Figura 1.4) el átomo de Calcio tipo 1 (a, b) rodeado de 9 átomos de oxígeno cuya figura geométrica es la distorsión de un prisma triangular triapuntado mientras que el átomo de calcio tipo 2 (c,d) está rodeado de 7 aniones representando distorsiones de una bipirámide pentagonal ideal. El calcio tipo 1 tiene un número de coordinación de 9 y el calcio tipo 2 un número de coordinación de 7.

La estructura del grupo fosfato que está rodeado por 4 átomos de oxígeno formando el arreglo de un tetraedro y el hidróxido (Figura 1.5) junto con los calcio tipo 1 y 2 dan forma a la hidroxiapatita (Figura 1.6)

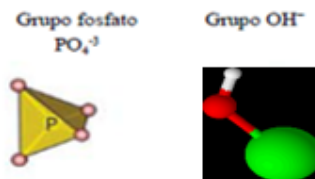


Figura 1.5 Estructura del fosfato y el hidróxido. (Campa, et. al, 2007).

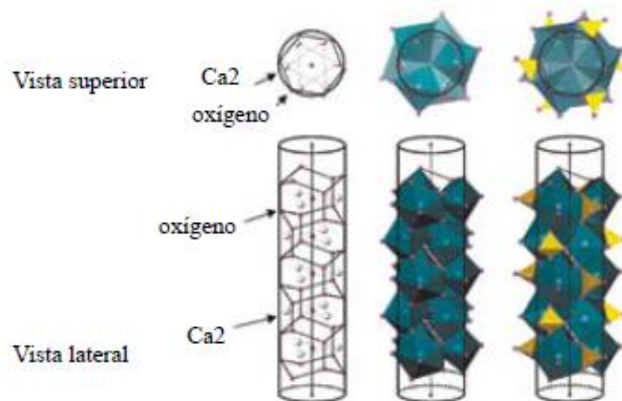


Figura 1.6 Simulación gráfica de la hidroxiapatita. (Campa, et. al, 2007).

Los grupos OH^- se disponen en una columna, orientados desordenadamente hacia arriba o hacia abajo a lo largo del eje de un cilindro (Izquierda de la figura 1.6). Sobre la superficie del cilindro de esa misma figura, se tiene un arreglo hexagonal de átomos de oxígeno. Los átomos de calcio tipo 2 están ubicados un poco desplazados del centro de cada hexágono (Izquierda de la Figura 1.6).

En el centro de la Figura 1.6 se observan bipirámides pentagonales con el vértice de una pirámide sobre el eje del cilindro y cuatro de los siete aniones de la bipirámide pentagonal forman parte de la malla hexagonal de oxígenos, mientras que en la derecha de la Figura 1.6 se puede observar adicionalmente tetraedros de grupos fosfatos con 2 de sus oxígenos formando parte de la malla hexagonal y los otros 2 proyectados hacia afuera del cuerpo del cilindro.

Con esta descripción es posible imaginar los grupos OH^- con una cierta posibilidad de moverse a lo largo del eje del cilindro. La carga -1 del grupo OH debe viajar entonces bajo las fuerzas de interacción de cargas negativas -2 (los oxígenos de la malla hexagonal) y cargas positivas $+2$ (de los calcios tipo 2) un poco desplazados del centro de cada hexágono en la malla (Izquierda Figura 1.6) (Campa, *et. al*, 2007).

Los 7 aniones más cercanos al calcio tipo 2 que forman la bipirámide pentagonal son: el oxígeno del grupo OH^- que se encuentra en el eje del cilindro, cuatro oxígenos que forman parte de la malla hexagonal y otros dos más que se encuentran fuera del cuerpo del cilindro (Centro Figura 1.6). Los tetraedros PO_4^{3-} se colocan de tal manera que cada uno de ellos une dos bipirámides pentagonales de $\text{Ca}(2)$ compartiendo una arista con una y un vértice con la otra (Derecha Figura 1.6 y Figura 1.7) (Campa, *et. al*, 2007).

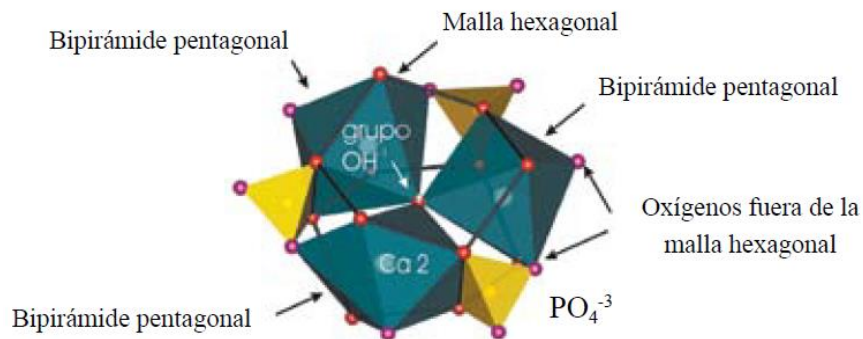


Figura 1.7 Interacción del calcio tipo 2 con el grupo OH y los grupos PO_4^{3-} . (Campa, *et. al*, 2007).

Como se ha mencionado la fase inorgánica está compuesta principalmente por cristales de fosfatos de calcio, dentro de los cuales, la hidroxiapatita (HAp) es la más abundante e importante. Por esta razón, la investigación básica y aplicada en el campo de los biomateriales, se ha enfocado en el desarrollo de métodos de síntesis y procesamiento de cerámicas a base de fosfatos de calcio y, en particular, de HAp. Dentro de este campo de estudio, se ha encontrado que el control de la macro y micro porosidad es un factor importante para mejorar la eficiencia de un material implantado (LeGeros, *et. al.*, 1988).

Se han realizado muchos experimentos en la preparación de HAp, sin embargo se encuentran aún en etapa de desarrollo e investigación ya que los polvos obtenidos parecen no ser del todo apropiados para ser utilizados como precursores de cerámica debido a que presentan baja cristalinidad y no son homogéneas sus composiciones y sus formas La tabla 1-3 presenta un resumen de los métodos.

Tabla 1-3 Técnicas de preparación de hidroxiapatita (Campa, et al., 2007).

| Técnica | Materiales iniciales | Condiciones de síntesis | Observaciones |
|--|--|--|---|
| Síntesis en estado Sólido a altas temperaturas | $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{CaCO}_3$ $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 + \text{CaCO}_3$ | 900 - 1300°C, usualmente con flujo de vapor de agua. | Ca/P = 1.67, gran tamaño de grano, formas irre- gulares e inhomo- géneos. |
| Síntesis en fase acuosa | $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{H}_3\text{PO}_4$ | T de reacción = 100°C pH: 7-12 | Ca/P < 1.67 cristales irregulares pequeños con baja cristalini- dad. |
| Métodos hidrotérmicos | HAp preparada por vía húmeda, otros fosfatos de calcio, etc. | 100-200°C, 1-2 MPa 300-600°C, 1-2 Kbar | Ca/P = 1.67 cristales de dife- rentes tamaños, homogéneos. |
| Crecimiento a partir de sales fundidas | $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y CaF_2 , o CaCl_2 | 1650°C | Cristales grandes, deformaciones durante el crecimiento. |
| Crecimiento en geles | Gel + $\text{Ca}^{2+} + \text{PO}_4^{3-}$ | pH: 7-10 T = 40, 60°C. | Se obtiene HAp, OCP, monetita y brushita. |

1.3.2. Fase Orgánica

La matriz orgánica está formada por fibras de colágeno y proteínas no colágenas incluidas en una sustancia fundamental, formada esencialmente por proteoglicanos. Esta matriz contiene principalmente fibras de colágeno tipo I y en menor medida, el colágeno de tipo V. Se han encontrado vestigios de otros tipos de colágeno, como los tipos III, XI y XIII. El colágeno representa aproximadamente el 90% de la matriz. El resto está constituido por las proteínas no colágenas que son indispensables para el desarrollo, crecimiento y reparación del hueso.

Son sintetizadas por las células óseas, y se pueden dividir en tres grupos: (Ross M.H. y Pawlina W., 2007).

- a) Proteínas glicosiladas, como la fosfatasa alcalina, osteonectina, tetranectina, tenascina-C y tenascina-W.
- b) Glucoproteínas multiadhesivas, como la osteopontina, sialoproteína ósea, fibronectina, vitronectina, fibrilina 1 y 2, entre otras.
- c) Proteínas dependientes de la vitamina K osteoespecíficas, que incluye a la osteocalcina, que captura el calcio desde la circulación, atrae y estimula los osteoclastos. Esta proteína, de 5 kDa conocida también como proteína Gla ósea (BGP), la producen células de la estirpe osteoblástica y se relaciona con el proceso de mineralización ósea. Posterior a su síntesis, la mayor parte se incorpora a la matriz extracelular del hueso pero pequeñas cantidades se liberan a la circulación (Ross M.H. y Pawlina W., 2007).

El colágeno tipo I es la proteína extracelular más abundante en el tejido óseo. La molécula que le corresponde (tropocolágena) está constituida por tres cadenas α de 300 nm en longitud y 1.4 nm de diámetro, con cada cadena α con aproximadamente 1050 residuos de aminoácidos. Las tres cadenas son hélices izquierdas: dos de ellas son idénticas, con igual secuencia de aminoácidos y se denotan como $\alpha(1)$. La tercera cadena, se denota como $\alpha(2)$, y tiene una secuencia de aminoácidos diferente. La secuencia de aminoácidos en éstas cadenas α , se

pueden describir así: (Gly-X-Y)_n, donde Gly representa un residuo de glicina, X es frecuentemente prolina, e Y una hidroxiprolina (Figura 1.8) (Campa, *et al.*, 2007).

El colágeno tipo I tiene una alta estabilidad térmica debido principalmente al arreglo estructural que presenta, y a los enlaces químicos débiles y fuertes, como los puentes de hidrógeno formados por las moléculas de agua. Dichos enlaces se encuentran entre las cadenas que forman la triple hélice entre los grupos amino y carboxilo del esqueleto de la cadena polipeptídica (Campa, *et al.*, 2007).

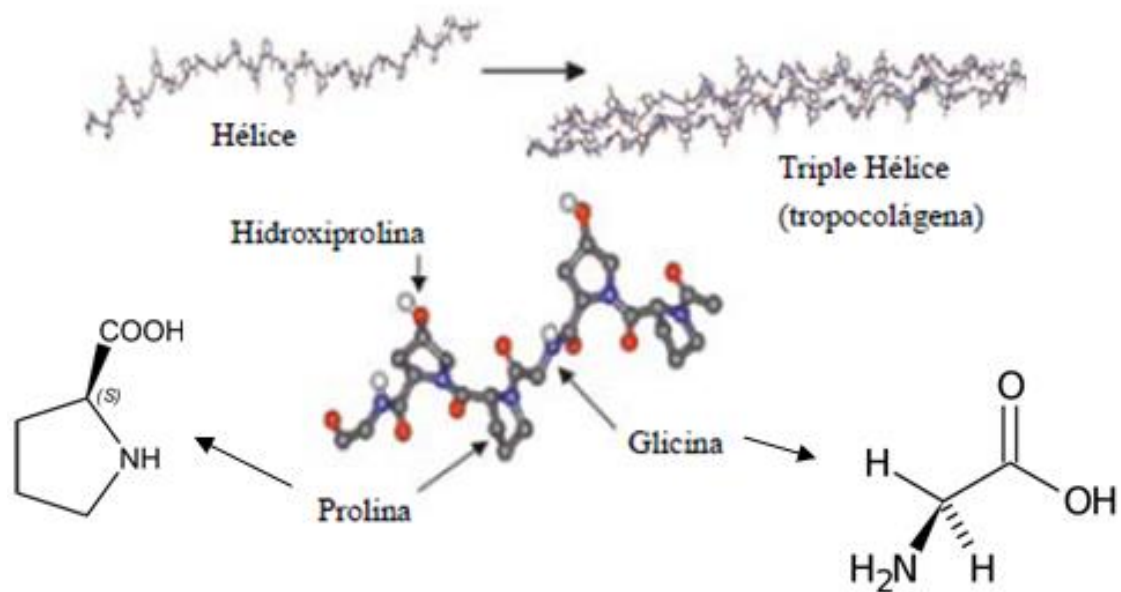


Figura 1.8 Colágeno Tipo 1. (Campa, *et al.*, 2007).

El arreglo de moléculas tropocolágenas constituyendo una fibrilla no es continuo: hay espacios de 40 nm entre el extremo final de una tropocolágena y el extremo inicial de otra.

La proporción de aminoácidos en el colágeno tipo I está dada por la siguiente tabla. (Tabla 1-4).

Tabla 1-4 Composición porcentual de aminoácidos en colágeno tipo I (Campa, et al., 2007)

| Residuo | | % |
|---------|----------------|-------|
| GLY | Glicina | 31.90 |
| ALA | Alanina | 11.35 |
| VAL | Valina | 2.36 |
| LEU | Leucina | 2.55 |
| ILE | Isoleucina | 1.33 |
| MET | Metionina | 0.53 |
| PHE | Fenil alanina | 1.39 |
| PRO | Prolina | 12.30 |
| HPRO | Hidroxiprolina | 10.00 |
| SER | Serina | 3.50 |
| THR | Treonina | 1.80 |
| TYR | Tirosina | 0.45 |
| ASP | Asparagina | 4.70 |
| GLU | Glutamina | 7.20 |
| ARG | Arginina | 4.71 |
| LIS * | Lisina | 2.80 |
| HLYS* | Hidroxilisina | 0.35 |
| HIS | Histidina | 0.58 |

1.4 Antecedentes

La HAp está compuesta esencialmente por fósforo y calcio, con una relación calcio-fósforo de 1.67. (Ortega, M. 2001). Este fosfato de calcio, que se puede obtener de forma sintética, presenta características de biocompatibilidad, no toxicidad, estabilidad química, osteoconducción y bioactividad; tales propiedades hacen al material muy práctico para usos médicos (Londoño, *et. al.* 2006)

Para que la HAp funcione correctamente como biomaterial, debe ser lo suficientemente porosa para permitir la penetración celular, crecimiento de tejido interno, incursión vascular rápida y suministro de nutrientes (Chu y Liu 2008), así como cumplir con las siguientes propiedades:

- a) Debe ser biocompatible, lo cual permite el crecimiento celular, su adhesión a la superficie y proliferación.
- b) El material debe inducir la unión de huesos fuertes, lo que resulta en osteoconducción y osteoinducción.

- c) La velocidad de formación de nuevo tejido y biodegradación deben coincidir entre sí.
- d) La resistencia mecánica del implante debe ser la adecuada para proporcionar el soporte adecuado antes de la regeneración.
- e) La estructura porosa, con tamaño de poro mayor a 100 μm , permite penetración celular, crecimiento de tejido y vascularización

Un método convencional para sintetizar HAp es la precipitación en un medio acuoso inicial de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como materia prima. La síntesis de HAp pura por este método requiere de control de muchos parámetros como el pH de reacción, tiempo de madurez, temperatura y estequiometría de la materia prima. Una pequeña variación de estos parámetros puede generar variaciones drásticas en la composición del producto final (Hornez, *et. al*, 2007).

Para esta tesis se usó el método hidrotermal asistido por microondas porque la síntesis por microondas es un método rápido, simple y eficaz para preparar materiales inorgánicos de tamaño nanométrico y en comparación con los métodos convencionales, la síntesis de HAp por microondas tiene las ventajas de un rápido crecimiento, tamaño de partícula pequeño y la distribución estrecha de tamaño de partícula debido a la nucleación rápida (Jansen, *et. al*, 1992).

En el 2001 en New Jersey y en la India (Riman, *et. al.*) se comparó el método mecanoquímico hidrotermal y el método hidrotermal asistido por microondas para sintetizar HAp; se hicieron las mezclas de los precursores necesarios para llevar a cabo la síntesis controlando las condiciones termodinámicas, en el caso del método hidrotermal se sintetizó por medio de microondas, y en el método mecanoquímico hidrotermal se mezclaron los precursores a temperatura ambiente y después se centrifugaron; en conclusión la técnica hidrotermal demostró tener un buen control sobre el tamaño y la morfología de la HAp mientras que la técnica mecanoquímica permite controlar de forma precisa la composición de la HAp pero tiene un bajo control sobre la morfología de la hidroxiapatita.

Después (Bose *et, al.*) en Washington en el 2009 se sintetizaron nanopulvos por un método estándar en el microondas que después dispersaron en agua junto con amonio polimetacrilato y después se secó y compactó en gránulos de 12.5 milímetros de diámetro que se sinterizaron a 600°C por 2 horas, haciendo las caracterizaciones necesarias se demostró que las propiedades mecánicas tales como la resistencia a la compresión, la dureza y la fractura aumentan cuando decrece el tamaño del grano, además se estudió las propiedades biológicas in vitro e indicaron que las superficies con granos finos de HAp proveen una mejor interacción hueso - material que una muestra de grano grueso que se hace interaccionar con tejido óseo.

En Iran (2008) se produjo el proceso de precipitación de HAp con transformaciones cristalográficas no comunes (Arami *et, al.*), el experimento consistió en irradiar microondas a la siguiente solución $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}/\text{CTAB}/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ durante 5 minutos y el precipitado se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos, el resultado nanocintas con carencia de morfología pero con una orientación marcada en [002]. Se empezó a trabajar con microondas para sintetizar HAp y modificando los parámetros de reacción de este método se fueron controlando las morfologías de la síntesis, así el grupo de investigación de Siddharthan, Seshadri, Sampath (2006) encontró que mientras se aumenta la potencia de las microondas el tamaño de la nanoestructura disminuye, el trabajo consistió en mezclar nitrato de calcio tetrahidratado con ácido fosfórico y someterlo a microondas con potencias de 175-385 W en la primera síntesis, de 525 W en la segunda síntesis y 660 W en la tercera síntesis y compararlo mediante microscopia.

Luego (Cabrera, Velázquez, Rivera, 2011) se observó que la cantidad de ácido glutámico que se le agrega a la mezcla afecta la forma de la nanoestructura, si no se agrega ácido glutámico no se obtiene una forma definida de 1.78 a 2 gr en 50 ml se obtienen nanoplacas y con 2.17 gr en 50 ml se obtienen nanofibras, estas nanofibras y nanoplacas de HAp se sintetizaron al mezclar fosfato monobásico de potasio e hidróxido de potasio por un lado y por otro mezclar nitrato de sodio con ácido glutámico ambas soluciones en agua desionizadas, una vez disueltas se

mezclan juntas, para después vaciarlos en viales presurizados de teflón que se calientan por microondas.

Es importante mencionar que las propiedades mecánicas de la HAp con porosidad controlada mejoran considerablemente, cerámicas porosas con diferentes morfologías porosas y distribución de tamaños pueden ser fabricadas por diferentes procesos como: quemar una esponja polimérica impregnada de una solución cerámica, sinterización en estado sólido, proceso sol-gel, replicación de espumas poliméricas por impregnación y el proceso gelcasting. (Zhang, *et. al*, 2006). Es posible obtener HAp altamente pura con porosidades diferentes pero controladas variando la temperatura de sinterización y/o introduciendo grafito o PMMA como agente generador de poros, eliminándolos en el proceso de sinterizado sin dejar residuos. (Hornez, *et. al*, 2007). En 2009 (Cordell, JM., *et. al*) se preparó una suspensión coloidal de HAp y la mezclaron con microesferas de PMMA, para utilizarlas como formadores de poros, en la misma relación volumétrica. Sometieron las piezas a tratamiento térmico para eliminar la fase orgánica y sinterizar las partículas cerámicas. De esta forma obtuvieron piezas con porosidad entre 4 y 10 μm de diámetro.

Como se mencionó anteriormente el material híbrido poroso hecho de HAp muestra un efecto sinérgico en las mejoras de las propiedades mecánicas. En el artículo Improvement in mechanical properties of hydroxyapatite objects with controlled porosity made by modified gelcasting process (Rivera, Velázquez, Rodríguez, 2003) las nanoestructuras de HAp se mezclan con los polímeros de polivinil butiral y ácido poliacrílico, las microesferas de PMMA, etanol como solvente y etilenglicol como dispersante. Esta mezcla forma una pasta cerámica. La cual es fácilmente moldeable para darle la forma deseada. Los componentes de esta mezcla entran en reacción química y se produce una gelación, la cual hace que la mezcla tenga una consistencia mucho más viscosa y que adquiera dureza, finalmente se somete a un ligero proceso de sinterizado con lo que se obtiene porosidad controlada.

Finalmente para obtener un material compuesto que sea parecido al hueso humano la HAp debe contar con fase orgánica que sinérgize sus propiedades, esto fue probado (Rivera, Velázquez y Muñoz, 2007) al caracterizar mecánicamente el compuesto orgánico-inorgánico que se obtuvo de realizar el método de gel casting modificado a base de HAp con solución de moléculas orgánicas gelatinosas inmersas, se hizo un análisis Infrarrojo de la muestra antes y después del método de gel casting modificado y se analizaron, se llevó acabo también un análisis de rayos X y por último una prueba de compresión con estas caracterizaciones se demostró que no hubo cambio en la composición lo cual es favorable y cuando se le agrego la sustancia orgánica se encontró más señales lo que sugiere un enlace químico entre la fase orgánica e inorgánica y se mejoró dramáticamente la resistencia a la compresión y mostró una elasticidad no lineal.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

El control de las variables en la síntesis hidrotermal asistida por microondas permitirá obtener HAp con una relación Ca/P deseable y una orientación cristalina en "C". Además con la inclusión y dispersión de microesferas de PMMA por el método de gel casting modificado y con el tratamiento térmico adecuado, se controlará la porosidad para el material compuesto. Por último, la incorporación de una fase orgánica, a fin de formar un material compuesto orgánico-inorgánico, incrementará las propiedades mecánicas de las piezas obtenidas.

2.2 Objetivo General:

El desarrollo de tecnologías que permitan la elaboración de nanoestructuras de HAp principalmente nanofibras, las cuales posteriormente podrían ser utilizadas para la elaboración de biomateriales con fases orgánico-inorgánico con porosidad controlada para su aplicación a mediano y corto plazo en diferentes áreas de la medicina.

2.3 Objetivos Específicos:

Sintetizar nanofibras de HAp donde se tenga el control en su morfología, dimensiones y orientación de crecimiento cristalino y que además el proceso sea reproducible.

Controlar la relación Ca/P en las nanofibras en una relación atómica similar a la obtenida en la matriz ósea (Relación Ca/P atómica = 1.67).

Elaborar un material con porosidad controlada que tenga como fase inorgánica nanofibras de HAp y que al agregar fase orgánica como resultado sinérgicen las propiedades mecánicas.

Hacer las caracterizaciones necesarias (Difracción de rayos X, Microscopía de alta resolución (SEM), Fluorescencia de rayos X, Adsorción y Desorción de nitrógeno, Calorimetría, Espectrometría, y Pruebas mecánicas) durante y después de los experimentos con el fin de entender mejor los resultados y poder emitir las conclusiones lo mejor posible.

3. METODOLOGÍA

3.1 Síntesis de Hidroxiapatita

La síntesis de materiales a través de métodos hidrotermales asistidos por microondas ofrece las ventajas de proporcionar un calentamiento homogéneo durante todo el volumen y una muy eficiente transformación de energía (Rivera, *et. al.*, 2010). Además tiene las ventajas de un rápido crecimiento, tamaño de partícula pequeño y la distribución estrecha de tamaño de partícula debido a la nucleación rápida (Jansen, *et. al.*, 1992).

El método hidrotermal asistido por microondas utilizado para la síntesis de HAp, consiste en promover la formación de la misma a partir de disoluciones acuosas a una temperatura interna alrededor de 170°C. Para alcanzar tal temperatura sin permitir la evaporación del solvente, la presión también es elevada y controlada. La síntesis de la HAp se llevó a cabo en el horno de microondas Synthos 3000 de Anton Paar en el rotor XQ-80 en viales de cuarzo presurizables. (Figura 3.1 y 3.2). La manera de operar del microondas se explica en el Anexo 6.1.



Figura 3.1 Microondas Synthos 3000 con rotor XQ-80



Figura 3.2 Vial de Cuarzo con chaqueta para rotor XQ-80

El procedimiento de síntesis por el método hidrotermal asistido por microondas fue desarrollado de la siguiente manera:

Primeramente se preparó una disolución de ácido glutámico [$C_5H_9NO_4 \cdot H_2O$] (J.T. Baker FW 147.13) y nitrato de calcio tetrahidratado [$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$] (Golden Bell FW 236.16) en 200 ml de agua desionizada, calentada y agitada durante 2 horas. Por otro lado se preparó una disolución de fosfato de potasio monobásico [KH_2PO_4] (Mallinckrodt Chemicals FW 136.09) junto con hidróxido de potasio [KOH] (SIGMA-ALDRICH 221473) en 200 ml de agua desionizada, calentada y agitada vigorosamente durante 15 minutos. Una vez obtenidas ambas disoluciones, se mezclan ambas disoluciones a las mismas condiciones.

Posteriormente se llenan y se preparan los viales (Anexo 6.2) con la disolución resultante para luego calentarlo por microondas con las siguientes condiciones de reacción: Potencia de 1200 W, Temperatura interna de $170^\circ C$, con un tiempo de rampa para llegar a esa temperatura de 10 min., un tiempo de reacción de 45 min. y un tiempo de enfriamiento de 10 min con una rápida velocidad de enfriamiento.

El precipitado depositado en el fondo de los vasos se filtra en un embudo buchner (el cual está colocado sobre un matraz kitasato) que contiene papel filtro

para que se lleve a cabo la recolección el cual se lava varias veces con agua desionizada y etanol. Finalmente se recolecta todo el precipitado (Figura 3.3).



Figura 3.3 Hidroxiapatita sintetizada por el metodo hidrotetmal asistido por microondas

3.2 Caracterización de la síntesis de HAp

3.2.1. Difracción de Rayos X por polvos

Los Rayos X son radiaciones cuya longitud de onda oscila entre 0.02 \AA a 100 \AA y al igual que la luz ordinaria, se manifiesta en forma de energía radiante, siendo emitidos por los átomos debido a profundas perturbaciones en sus estructuras electrónicas. Toda sustancia cristalina dispersa rayos X en su propio patrón de difracción, produciendo una “huella” de su estructura atómica y molecular. La difracción de rayos X presenta una característica única con la cual los componentes se identifican como compuestos específicos a partir de sus diagramas de difracción (Explicación del funcionamiento del difractómetro en el Anexo 6.3).

Para la medición de la difracción se llevó a cabo los siguientes pasos: Se coloca la muestra a analizar (HAp) hasta llenar el porta muestras al ras, luego el porta muestras fue colocado sobre el difractómetro Bruker D8 Advance (Figura 3.4) donde se les hace incidir el haz de rayos X a la muestra con una longitud de onda de 1.54 \AA correspondiente a la emisión K_{α} de Cu. Las condiciones del equipo para

el análisis fueron 30 KV y 30 mA, el análisis se llevó a cabo desde 10 a 80° en 2 theta con un salto .01 y con un tiempo de permanencia de 1 segundo en cada salto La identificación de especies a partir de su figura de difracción de polvo cristalino se basa en la posición de las líneas (en términos de θ o 2θ) y de sus intensidades relativas.

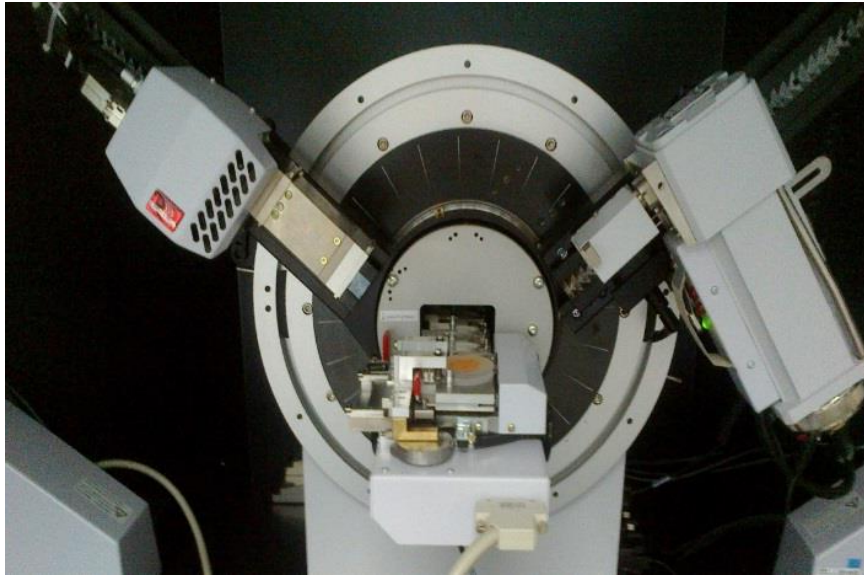


Figura 3.4 Difractometro de Rayos X por polvos

3.2.2. Espectroscopia de dispersión de energía (EDS)

La detección de rayos X emitidos por la muestra permite realizar análisis elemental de la misma. Estos análisis pueden demostrar la distribución de un determinado elemento o de varios tipos de átomos diferentes en la muestra de estudio, o si existe o no en una zona del espécimen cierto elemento, y aún estimar cuantitativamente la abundancia de un elemento.

Consiste en bombardear al objeto con electrones primarios los cuales si tienen la energía apropiada generan la emisión de rayos X característicos provenientes de la muestra bajo análisis. Cuando el haz de electrones de alta energía interactúa con la muestra, expulsa electrones de las capas internas dejando

vacancias. Con esto se tiene un átomo ionizado el cual regresa a su estado fundamental emitiendo fotones de rayos X característicos. Estas transiciones electrónicas en forma de fotones de rayos X corresponden a transiciones entre capas externas y la capa K.

La energía e intensidad de los rayos X característicos del material depende de la composición de la muestra. Estos rayos X se captan en un sensor que convierte a esta señal en un voltaje que es proporcional a la energía del fotón de rayos X.

El procedimiento para analizar las muestras de HAp fue el siguiente: Se adhirió la muestra de HAp a un porta muestras de polímero, utilizando cinta de carbón para fijarla. Este porta muestras se analizó por el microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6390 LV (Figura 3.5) con un voltaje de aceleración de 20 kV (El principio del EDS se explica en el Anexo 6.4).



Figura 3.5 Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6390L.

3.2.3. Fluorescencia de Rayos X (XRF)

Consiste en emisión de rayos X secundarios (o fluorescentes) característicos de un material que ha sido excitado al ser «bombardeado» con rayos X de alta energía o rayos gama. Este fenómeno es muy utilizado para análisis elemental y análisis químico.

Cada elemento posee orbitales electrónicos de energías características. Al producirse la remoción de un electrón de una capa interior por un fotón energético proveniente de una fuente primaria de radiación, un electrón de una capa exterior se desplaza y ocupa el hueco que se había formado.

Cada una de estas transiciones produce un fotón fluorescente dotado de una energía característica que es igual a la diferencia de energía entre los orbitales inicial y final. La longitud de onda de esta radiación fluorescente se puede calcular a partir del postulado de Planck: $\lambda = h \cdot c / E$ (Principio físico de la fluorescencia de rayos X en el anexo 6.5).

Una vez ordenadas, la intensidad de cada radiación característica se relaciona directamente con la cantidad de cada elemento químico del material de la muestra. Esto aporta la base de una poderosa técnica utilizada en química analítica.

Para este proyecto de tesis se realizó el análisis de las muestras dispersadas en 1 ml de alcohol isopropílico y se añadió Hierro como estándar interno. Las condiciones de operación fueron de un voltaje de 50 kV y una radiación de potasio molibdeno como excitación en el equipo Bruker S2 Picofox (Figura 3.6).



Figura 3.6 Equipo para fluorescencia de Rayos X

3.2.4. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Para estudiar en gran detalle la superficie de los sólidos, se cuenta con un aparato llamado microscopio electrónico de barrido (SEM) (Figura 3.5) el cual, a diferencia de los microscopios ópticos, utiliza la interacción de electrones con la superficie bajo estudio para formar una imagen de ella. La microscopía electrónica de barrido se basa en algunos de los procesos que tienen lugar al hacer interaccionar un haz muy fino de electrones de alta energía con un material. Como resultado de esta interacción, la superficie puede emitir electrones reflejados, transmitidos, Auger y retrodispersados. Con estos últimos, es posible obtener imágenes de la morfología superficial de una muestra dada.

Las imágenes en un microscopio electrónico de barrido se obtienen al barrer un haz de electrones enfocado en la superficie del material que se desea analizar. Se sigue un patrón de líneas paralelas sobre la superficie y se miden los electrones secundarios o retrodispersados que son emitidos desde la superficie de la muestra. La corriente de electrones se colecta y amplifica y la variación en la intensidad de la señal, que resulta del barrido del haz a través de la muestra, forma un mapa de intensidades con lo cual se forma una imagen (Figura 3.7)

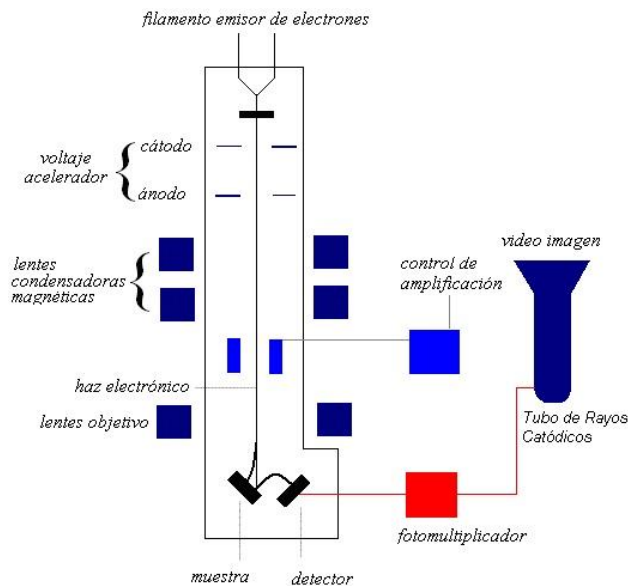


Figura 3.7 Esquema de un microscopio electrónico de barrido

Para la observación de las muestras en el microscopio electrónico de barrido es necesario fijarlas en un porta muestras cilíndrico metálico (Cobre, latón aluminio, etc.), previamente pulido y limpio, utilizando cinta de carbón. Las muestras pueden ser recubiertas con una fina capa de Au. Para fines del presente trabajo, las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6390L (Figura 3.5) a 20 kV y fueron recubiertas con oro.

3.2.5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Es un microscopio que utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto, debido a que la potencia amplificadora de un microscopio óptico está limitada por la longitud de onda de la luz visible. Lo característico de este microscopio es el uso de una muestra ultrafina y que la imagen se obtenga de los electrones que atraviesan la muestra.

El microscopio electrónico de transmisión emplea la transmisión/dispersión de los electrones para formar imágenes, la difracción de los electrones para obtener

información acerca de la estructura cristalina (así como la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de la muestra) (Anexo 6.6)

Para la preparación de la muestra, la muestra se secó y después una pequeña cantidad de material fue puesta en una rejilla de cobre con una película de 3 mm de diámetro luego las muestras se observaron utilizando un JEOL JEM-2100F (Figura 3.8) usando 120 kV como tensión de aceleración, en campo brillante convencional.



Figura 3.8 Microscopio electrónico de transmisión

3.3 Método de gel casting modificado

Este método tiene la ventaja de tener una formación rápida del gel y además, pueden producirse piezas de tamaño, forma y porosidad controlada (Rivera, et. al, 2001).

Las muestras se gelaron por el método gelcasting modificado (Figura 3.9)

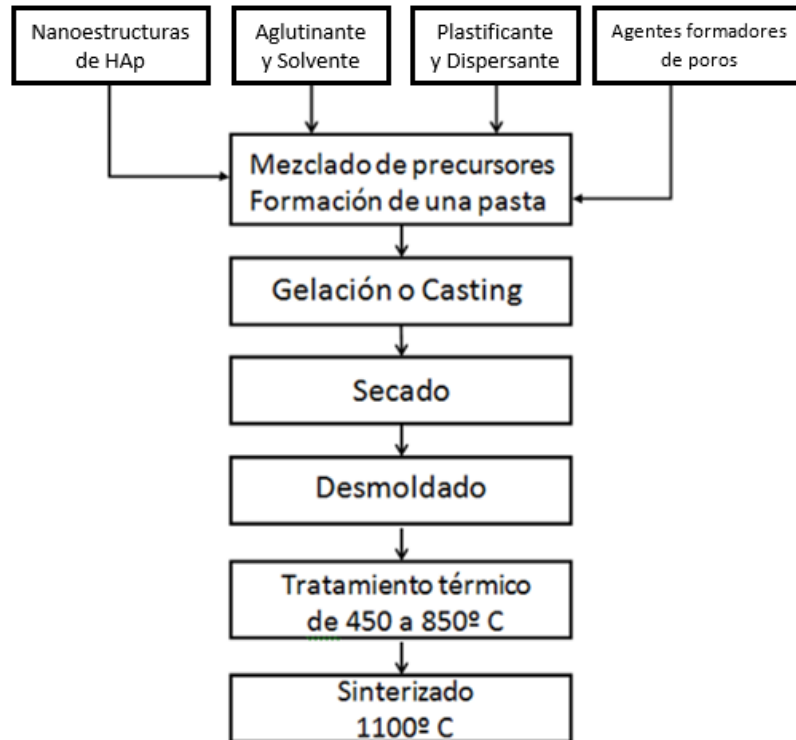


Figura 3.9 Diagrama del Gel Casting Modificado

Para realizar este proceso se utiliza la HAp previamente sintetizada como cerámico, el solvente debe ser capaz de disolver los polímeros que se van a utilizar pero sin reaccionar con los polvos cerámicos, así como evaporarse a temperaturas relativamente bajas. También debe utilizarse un dispersante para prevenir la aglomeración de los productos sólidos y mantener este estado estable durante todo el proceso, disminuyendo la viscosidad de la suspensión.

Los aglutinantes confieren resistencia mecánica a las piezas, para que puedan ser removidas, almacenados y trabajadas sin romperse. Conforme el solvente se evapora, se adhieren a la superficie de las partículas, se forma un sistema entrecruzado que le da resistencia mecánica necesaria a las piezas.

Para la preparación del cerámico se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Se mezcla etanol de J.T Baker (solvente) con Polivinil Butiral (PVB) de la marca ACROS con peso molecular de 36 000 (Aglutinante) el cual es agregado lentamente a temperatura ambiente hasta obtener una solución homogénea.
2. Por otro lado se funde polietilenglicol (PEG) de la marca FLUKA con peso molecular de 6000 (plastificante) y a continuación se añade el Ácido poliacrílico (APA) de FLUKA (dispersante) y se pone en agitación hasta que se disuelva.
3. La mezcla de polvos está conformada por HAp sintética, como se describió anteriormente, con Acido oxálico, esta mezcla se añade lentamente microesferas de polimetil metacrilato (PMMA).
4. Posteriormente se mezcla la solución del paso 1 con la solución del paso 2 hasta que queden mezcladas por completo ambas fases. Esta solución (paso 4) es añadida a la mezcla del paso 3.
5. Después se rellenan los moldes (previamente preparados) plenamente con la pasta cerámica resultante del paso 4. Debe comprimirse la pasta utilizando una espátula para asegurar el completo llenado del molde.
6. Se dejan secar las muestras en el molde a temperatura ambiente hasta que se evapore el etanol.
7. Finalmente se desmoldan las piezas (Figura 3.10)



Figura 3.10 Piezas de HAp obtenidas después del Gel Casting Modificado

Una vez desmoldadas las piezas cerámicas es necesario hacerle un tratamiento térmico (Figura 3.11) que elimine los polímeros, el tratamiento térmico se lleva a cabo en la mufla con un incremento de temperatura a razón de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta una temperatura de 1100°C temperatura y tiempo suficiente para eliminar los polímeros por completo, una vez alcanzado esta temperatura (1100°C) se mantiene calentando por 2 horas para lograr el sinterizado del material (Figura 3.12), finalmente se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente.

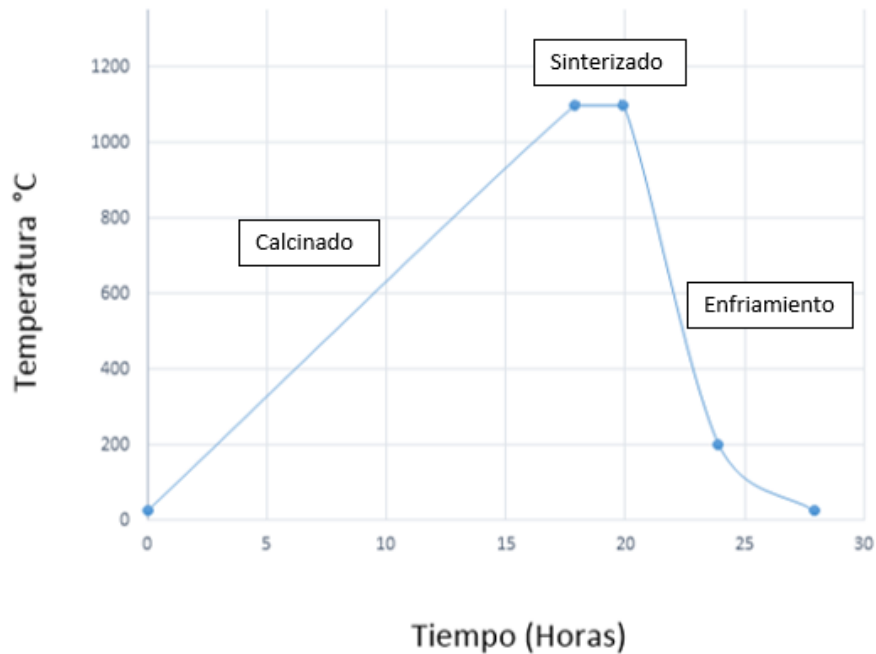


Figura 3.11 Grafica de tratamiento térmico a las piezas de HAp

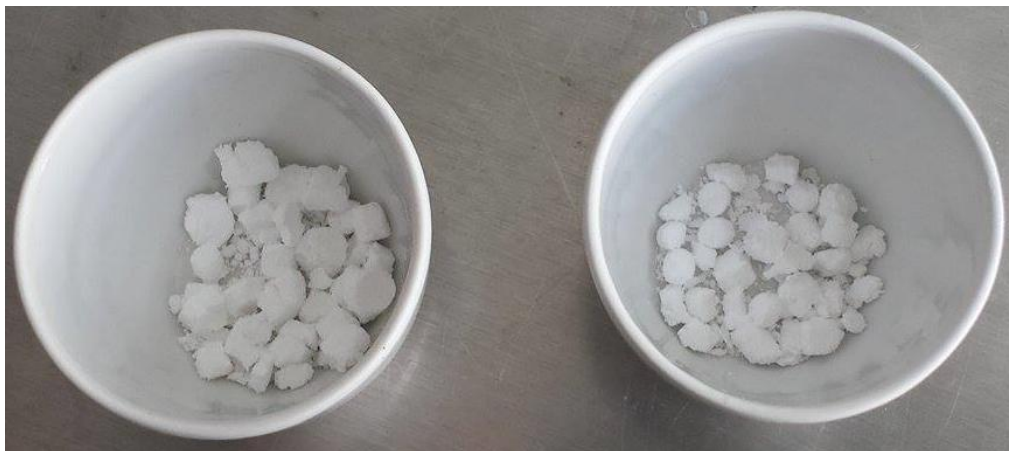


Figura 3.12 Hap después del Gel casting y sinterizada

Ya que se obtienen las piezas sinterizadas de HAp, se les agrega la fase orgánica para obtener finalmente el material compuesto orgánico-inorgánico (Figura 3.13).



Figura 3.13 Material compuesto orgánico-inorgánico

En el presente trabajo se consideran 3 concentraciones diferentes de fase orgánica con el objetivo de analizar la influencia, tanto de su concentración como de la porosidad, en las propiedades mecánicas del material compuesto.

La concentración se obtuvo como porcentaje en peso de la grenetina o colágeno disuelto en agua, de la siguiente forma:

$$\% FO = \left(\frac{W_{fo}}{W_s} \right) \times 100 \dots \dots \dots \text{Ecuación 1}$$

Donde W_{fo} es la cantidad en peso de fase orgánica hidratada, añadida a las piezas de hidroxiapatita poroso por absorción. Este registro se obtiene al pesar las muestras antes, durante y después de la adición de dicha fase, así como posterior al secado de las muestras. W_s es el peso de las muestras cerámicas después del PGCM, es decir, únicamente el material cerámico (Alonso, S. 2013.)

Los pasos de la introducción de la fase orgánica se describe a continuación:

Se disuelve grenetina en 50 ml de agua a 80°C y agitación magnética con una viscosidad de 3.3, 3.92 y 4.1 centipoise respectivamente, la viscosidad fue

medida en un viscosímetro de la marca brookfield versión DV2T, posteriormente se impregna el material de materia orgánica (6.6, 6 y 5.7 de concentración de fase orgánica en peso) por absorción, se mide la concentración y finalmente se deja secar a temperatura ambiente.

3.4 Caracterización del gel casting modificado

3.4.1. Adsorción y desorción de nitrógeno

El método BET implica la determinación de la cantidad de gas adsorptivo necesario para cubrir las superficies de poros internas accesibles y las externas con una monocapa completa de adsorbato. Los poros inaccesibles no se detectan. Esta capacidad de monocapa se puede calcular a partir de la isoterma de adsorción utilizando cualquier gas siempre y cuando adsorba físicamente mediante fuerzas débiles de van der Waals en la superficie del sólido y se pueda desorber mediante un descenso de la presión.

La teoría BET se basa en un modelo cinético del proceso de adsorción propuesto en 1916 por Langmuir en el que la superficie del sólido se considera una distribución de sitios de adsorción equivalentes. Sin embargo la isoterma de Langmuir ignora la posibilidad de formación de capas de fisisorción sobre la inicial (adsorción en multicapas), motivo por el que se llega a una saturación de la superficie a presiones altas. Adoptando el mecanismo de Langmuir pero introduciendo una serie de premisas que lo simplifican, Brunauer, Emmett y Teller (1938) fueron capaces de llegar a su bien conocida ecuación BET, que admitiendo la posibilidad de formación de multicapas, permite el crecimiento indefinido hasta producirse la condensación del gas.

La principal condición del modelo BET es que las fuerzas participantes en la condensación de gases son también responsables de la energía de enlace en la adsorción multimolecular. Esta condición se traduce en tres premisas:

- a) Cuando $P = P^0$ el gas adsorbato se condensa en un líquido sobre la superficie del sólido, es decir, el número de capas se hace infinito (P^0 : presión de saturación del vapor)
- b) Todos los centros de adsorción de la superficie son equivalentes. La capacidad de adsorción de un centro no depende del grado de ocupación de los centros vecinos.
- c) Sobre cada centro pueden adsorberse varias capas de moléculas, siendo el calor de adsorción para todas ellas equivalentes excepto para la primera. En todas las capas excepto en la primera las condiciones de evaporación y condensación son idénticas.

Las propiedades texturales de la HAp se determinaron a partir de las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno registradas a 77K utilizando un equipo Quantachrome iQ2. (Figura 3.14) Previo al análisis, las muestras fueron desgasificadas a 200°C la muestra sin proteína y a 80°C la muestra con proteína por 12 h a bajo vacío (10^{-4} mbar) para asegurar una superficie seca, limpia y libre de especies físicamente adsorbidas. El área específica de la muestra se calculó de acuerdo al método BET utilizando los datos de la curva de adsorción colectados en el intervalo de presión equilibrio relativa de $0.03 < P/P^0 < 0.3$. Las distribuciones del tamaño de poro se calcularon con los datos de la isoterma de desorción de las correspondientes isotermas de nitrógeno utilizando el método BJH. El volumen total de poro (V_{total}) se estimó a partir de la cantidad de nitrógeno adsorbido a la presión relativa de 0.99.



Figura 3.14 Quantachrome iQ2

3.4.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis de calorimetría se realizó por la técnica de DSC en el equipo Q2000 TA instruments, con el propósito de conocer la temperatura de desnaturalización de la fase orgánica (grenetina), el análisis se llevó a cabo de un rango de 25°C a 500°C con un calentamiento de 5°C por minuto y a la celda de calentamiento se le suministro 50 ml de nitrógeno por minuto para limpiarla.

3.4.3. Pruebas Mecánicas

Las pruebas mecánicas son pruebas destructivas en las que los materiales de estudio son sometidos a esfuerzos mediante la aplicación de una fuerza externa hasta su deformación y/o ruptura, para determinar sus propiedades de dureza, elasticidad, fragilidad y resistencia a la penetración.

El esfuerzo de compresión es la resultante de las tensiones o presiones que existe dentro de un sólido deformable o medio continuo, caracterizada porque tiende a una reducción de volumen del cuerpo, y a un acortamiento del cuerpo en determinada dirección.

Las distintas cargas que actúan sobre los huesos se encuentran relacionadas con las diversas actividades del individuo. El hueso debe ser capaz de soportar fuerzas de compresión, tracción y cizalladura.

Los ensayos de compresión-deformación se realizan con fuerzas que operan en servicio de compresión y la probeta se contrae a lo largo de la dirección de la fuerza. El material es deformado hasta la ruptura, con una carga de compresión que aumenta gradualmente y que se aplica de forma uniaxial a lo largo del eje de la probeta.

Para calcular el esfuerzo de compresión se utiliza la relación:

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

Donde F es la carga instantánea aplicada perpendicularmente a la sección de la probeta, en unidades de newtons (N) o libras (lb), y A_0 es el área (m^2 o in^2) de la sección original antes de aplicar la carga, por lo tanto, las unidades del esfuerzo a la compresión son lb/in^2 o N/m^2 .

La deformación se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\varepsilon = \frac{L_i - L_0}{L_0} = \frac{\Delta L}{L_0} \dots \text{Ecuación 3}$$

Donde L_0 es la longitud original antes de aplicar la carga, L_i es la longitud instantánea y es el cambio de la longitud $L_i - L_0 = \Delta L$ en un instante determinado con respecto a la longitud inicial producida por la deformación (Muñoz, P. 2009).

Los ensayos de pruebas mecánicas fueron de compresión y fueron llevadas a cabo en una máquina universal Zwick/Roell Z005 (Figura 3.15) con una carga de

5 KN y una velocidad de 1mm/min. Las piezas se someten a un proceso de desbaste para ajustarlas a las dimensiones de 5 mm asegurándose de tener caras paralelas.



Figura 3.15 Zwick/Roell Z005

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Difracción de Rayos X por polvos (XRD)

Los resultados de XRD confirmaron la obtención de cristales de HAp sintética. La identificación de la fase se realizó por comparación con los archivos del banco de PDF's (powder diffraction files) de la International Center for diffraction Data (ICDD) provisto por Brucker. Con el mencionado banco de datos se encontró que la fase de HAp obtenida es la correspondiente al PDF 86-1199. A continuación se muestra un difractograma de HAp con crecimiento cristalino aleatorio.

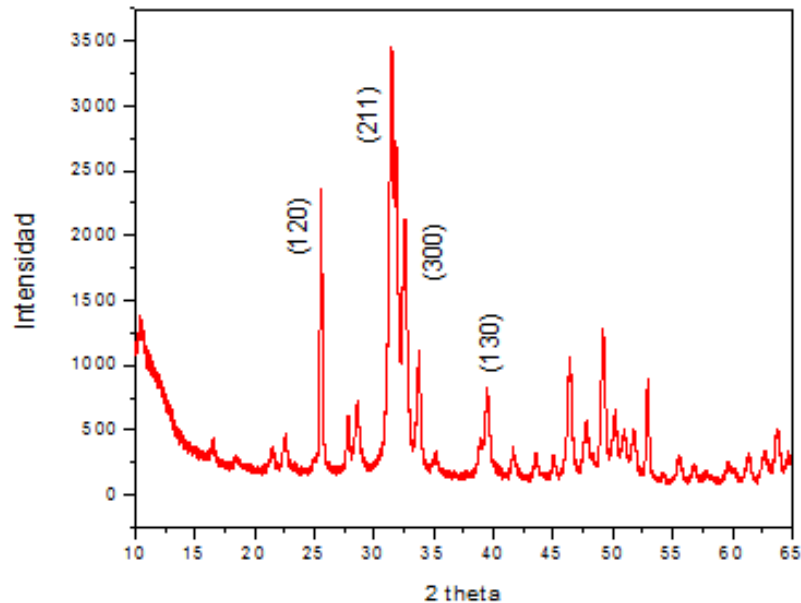


Figura 4.1 Difractograma de HAp con crecimiento cristalino aleatorio

Es importante mencionar que para la prueba de XRD la HAp no fue molida, la HAp que se recuperó de la síntesis tiene la apariencia de ser un polvo, lo que hizo posible el montaje en el portamuestra y la razón por la cual no fue molida fue para mantener la posible orientación cristalina presente en la muestra de HAp.

La figura 4.2 muestra un patrón de difracción típico de las muestras de HAp que se obtuvieron por el método hidrotérmal asistido por microondas.

Se puede observar en el difractograma de la figura 4.2 que la reflexión alrededor de 33° en la escala de 2θ , correspondiente a la familia de planos (300), es la que presenta la mayor intensidad registrada, y que dicha intensidad es notoriamente mayor que la esperada de acuerdo al registro del PDF 86-1199. Lo anterior es evidencia de una orientación cristalina preferencial en la dirección [300]. Asimismo, es posible observar como las reflexiones a 39.8° y 28.9° , las cuales corresponden a la contribución de los (130) y (120) respectivamente, también presentan una mayor intensidad a la esperada de acuerdo al citado PDF, aunque dicho incremento no es tan notorio como el observado para el (300).

Por otra parte, las señales en los ángulos de 25.8° , 32.2° y 34° , la intensidad relativa registrada en el correspondiente PDF para la HAp es mayor que la obtenida experimentalmente, lo cual también puede ser una consecuencia de la orientación preferencial que tiene el material obtenido.

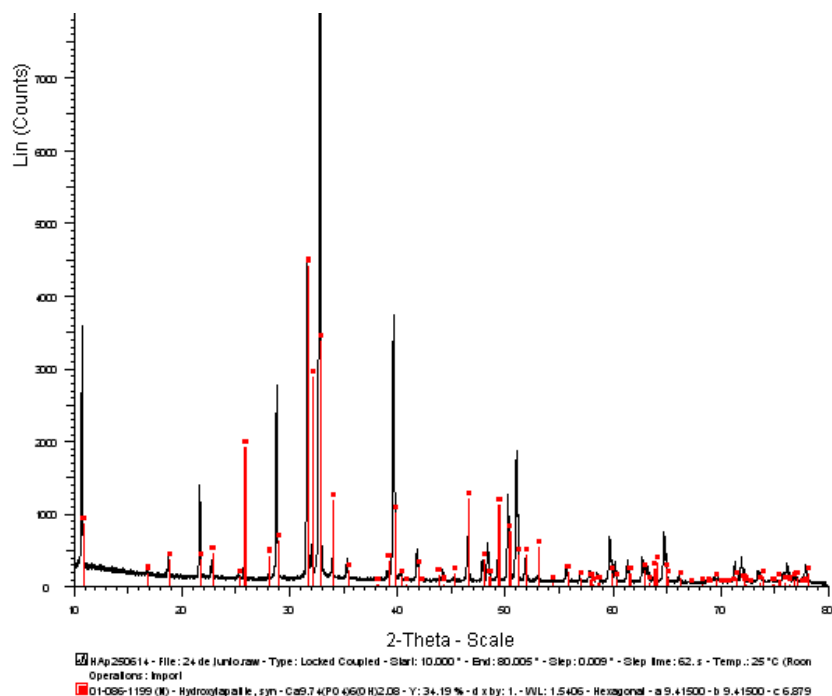


Figura 4.2 Difractograma típico de la HAp obtenido mostrando la identificación con el PDF correspondiente.

Se puede observar en la figura 4.2 como en 32.929 de la escala de 2 theta se observa la intensidad más alta correspondiente a la orientación (300) mientras que el PDF figura 4.1 muestra la intensidad más alta en 31.792 de la escala de 2 theta (211) lo que nos permite confirmar la existencia de una orientación cristalina muy clara.

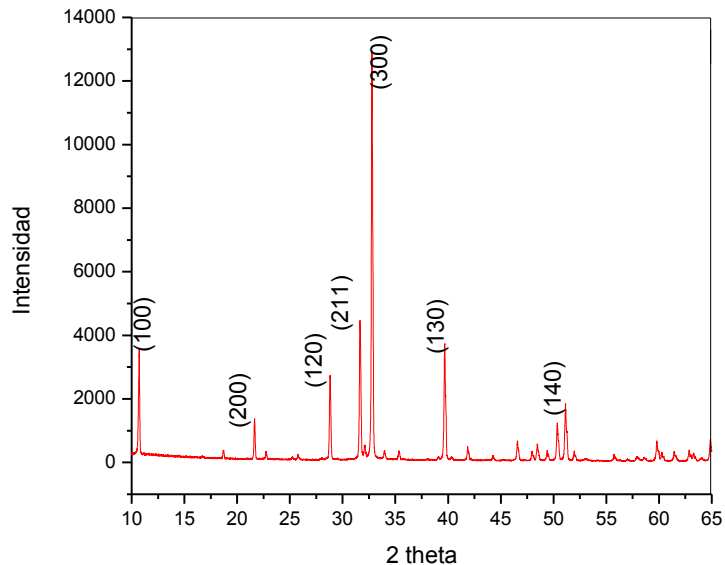


Figura 4.3 Difractograma indizado de la HAp obtenida a través del método hidrotermal asistido por microondas.

En el difractograma que aparece en la figura 4.3 están indicados los índices de Miller para las principales reflexiones, las cuales corresponden a los planos 300, 211, 100, 130, 120, 140 y 200 de la HAp acorde al PDF 86-1199. Cabe hacer notar que las señales en el difractograma están bien definidas y tienen bajo nivel de ruido, lo cual indica la presencia de HAp altamente cristalina. (Tripathi, G. y Basu, B. 2011). Utilizando el programa “EVA” provisto por Bruker, se determinó el tamaño promedio de cristalito en la HAp y se encontró un valor de 64.15 nm.

4.2 Espectroscopia de dispersión de energía (EDS)

Con el objeto de llevar a cabo un análisis elemental de la muestras de HAp, estando éstas dentro del microscopio electrónico de barrido y recibiendo la

incidencia de los electrones primarios, se registró la emisión de los diferentes fotones de rayos X característicos de los diferentes elementos presentes en la muestra. Lo anterior se realizó con el objeto de calcular la relación Ca/P presente en las muestras. (Goldstein, J. I., *et. al*, 1984).

En la Figura 4.4 se presenta un espectro típico de EDS para las muestras de HAp obtenidas por el método hidrotérmal asistido por microondas. Adicionalmente, en la figura se muestra una tabla de porcentaje atómico y de porcentaje en peso de los elementos detectados que constituyen a la HAp. En el espectro se observan las señales correspondientes a los átomos de Ca, P y O contenidos en la HAp. Con estos valores se calculó la relación en peso Ca/P de 2.265 y una relación atómica Ca/P de 1.75, es importante mencionar que se eliminaron las señales de carbono por que la muestra se montó sobre un polímero y los porcentajes se verían afectados. Se hace hincapié en la relación calcio fosforo porque como se mencionó anteriormente, la HAp estequiométrica tiene una relación en peso Ca/P de 2.151 y una relación atómica Ca/P de 1.667 mientras más se acerque a esta correlación mejor es su biocompatibilidad.

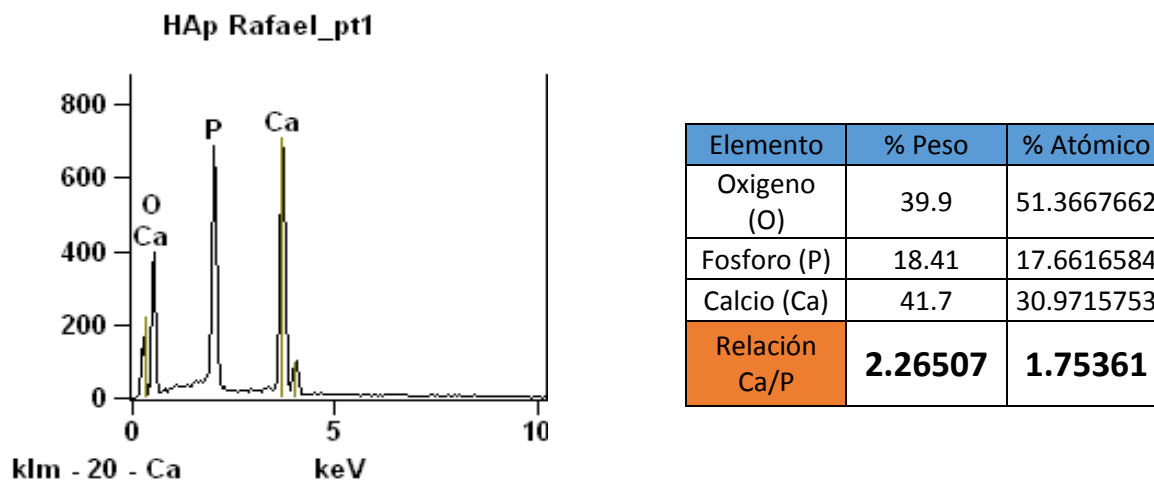


Figura 4.4 Espectro de EDS y tabla de porcentajes con relación calcio/fosforo de la HAp.

4.3 Fluorescencia de Rayos X (XRF)

Esta técnica analítica también fue utilizada para llevar a cabo un análisis elemental de las muestras de HAp. Los principios físicos en los que se fundamenta esta técnica de caracterización, son similares a los del EDS. Sus capacidades de caracterización se deben en gran parte al principio fundamental de que cada elemento tiene una estructura atómica única, la cual genera fotones de rayos X con longitudes de onda específicas; estos fotones se registran y cuantifican y con ello se produce un espectro de emisión de rayos X. En el espectro se grafica la energía de los fotones contra su intensidad. (Goldstein, J. I., 2003).

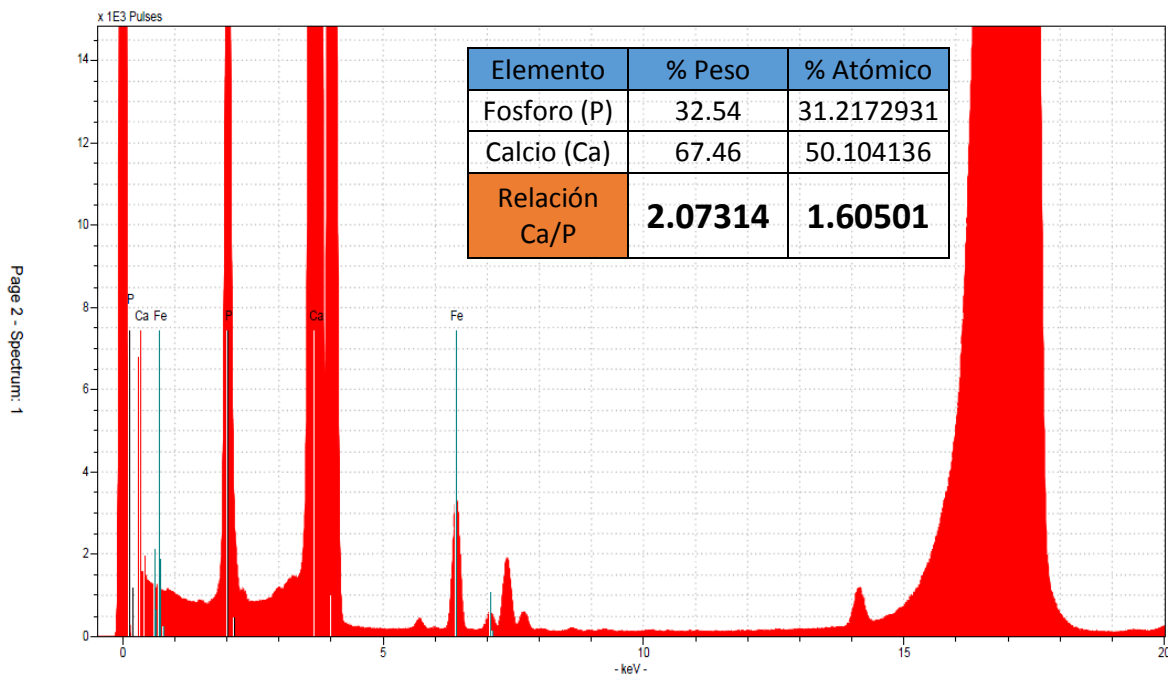


Figura 4.5 Espectro típico de un análisis de fluorescencia de Rayos X (XRF) a una muestra de HAp, presentándose las diferentes señales de los elementos presentes. En adición, se incluye una tabla de porcentajes de peso, atómico y relación Ca/P.

Se hizo una semi-cuantificación del porcentaje en peso y atómico de los elementos fosforo y calcio por XRF. Este análisis complementó la información obtenida por EDS. Es importante mencionar que en la gráfica se puede observar la presencia de hierro, este elemento fue utilizado como estándar interno para hacer la semi-cuantificación, pero no está presente en la HAp.

Los resultados son muy cercanos a la relación Ca/P ideal (2.151 en peso y 1.667 atómica) y se seguirá trabajando para tener una mejor relación Ca/P.

4.4 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

A continuación se muestran micrografías donde se puede observar claramente que la síntesis por el método hidrotérmal asistido por microondas con las condiciones empleadas en este trabajo, da como resultado la formación de nanofibras que presentan un perfil transversal hexagonal, con dimensiones de diámetro variables que van desde unos 200 nanómetros hasta unos 8 micrómetros (Figura 4.6).

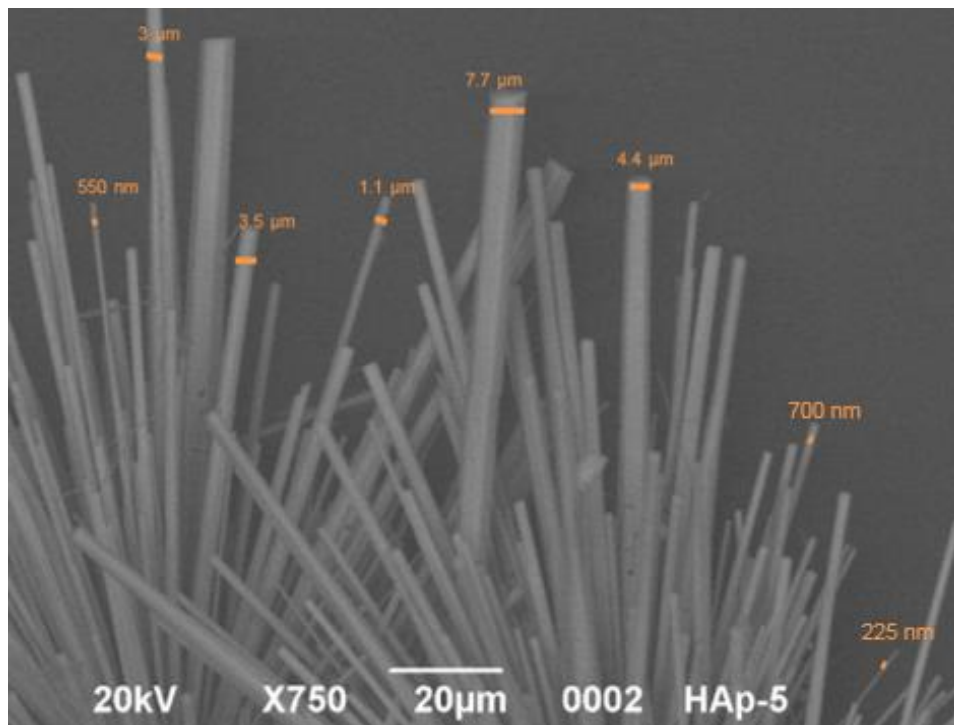


Figura 4.6 Micrografía de SEM a la síntesis de HAp.

También es posible observar por el extremo final de la nanofibra hexagonal que esta posee una apotema de 0.9 μm. (Figura 4.7). Es importante destacar que se obtuvieron exclusivamente nanofibras y no nanoplacas o nanopartículas lo cual

es deseable para los propósitos del presente trabajo. También en la mencionada figura, se encuentra un recuadro en la parte inferior derecha, en donde se pueden observar un par de nanofibras mostrando su sección transversal hexagonal.

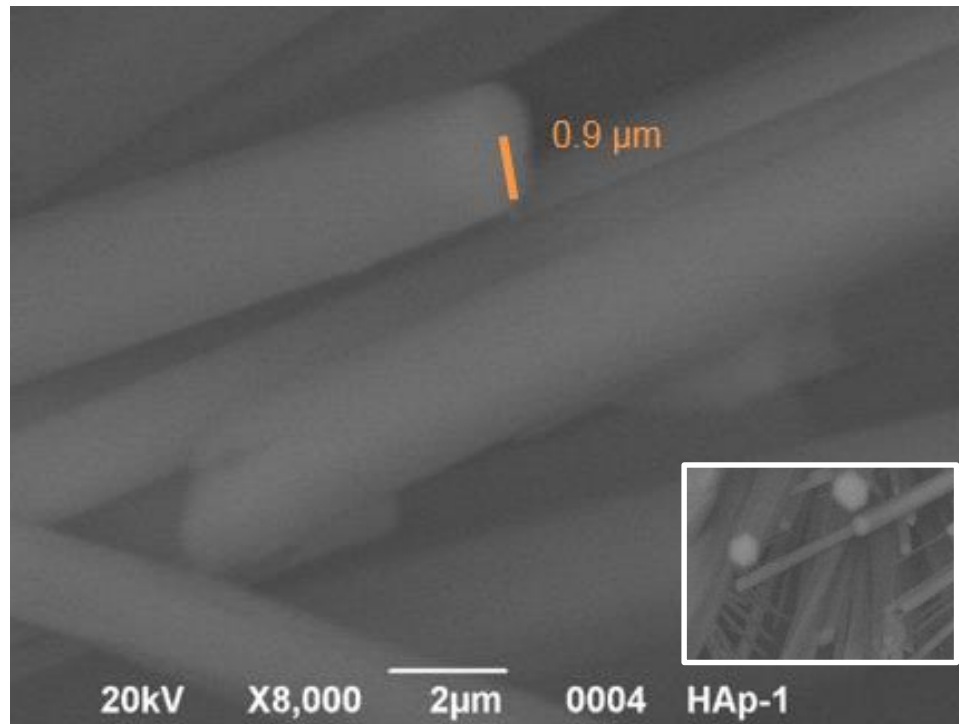


Figura 4.7 Micrografía de SEM de las nanofibras de HAp que permite observar su diámetro y su extremo final. Además, el recuadro de la parte inferior de la imagen muestra su perfil transversal hexagonal.

4.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

A través de HRTEM, se obtuvieron imágenes de las nanofibras de HAp en las que se puede ver claramente un ordenamiento espacial periódico. Dicho ordenamiento está formado por un arreglo de líneas y puntos que corresponden a la estructura cristalina de la HAp. Este arreglo espacial fue analizado por medio del software Digital Micrograph® diseñado por Gatan. Se determinaron las distancias de separación entre las líneas en la imagen, que corresponden a las distancias interplanares en la estructura de la HAp. En las Figuras 4.8 y 4.9 se muestran los resultados de dicho análisis. Podemos ver en la Figura 4.8 que las líneas que van

de izquierda a derecha (con cierto ángulo de inclinación) tiene una separación de 0.235 nm de distancia interplanar, esta distancia está relacionada a los planos (220) y las líneas que van de arriba hacia abajo (también con cierta inclinación) tienen un espaciamiento interplanar de 0.271 nm y corresponden a los planos (300). Asimismo, por medio del Digital Micrograph, se aplicó una transformada rápida de Fourier (FFT) a la región de la imagen contenida en el rectángulo blanco, la cual produjo el patrón de puntos mostrado en el recuadro de la parte superior derecha de la figura. Este patrón muestra un arreglo ordenado de puntos con simetría dos que está relacionado con la estructura cristalina de la HAp. Los puntos más intensos corresponden a los (300), lo cual es evidencia de su abundancia en la estructura cristalina, y el resto de menor intensidad están relacionados con los (220), lo anterior de acuerdo a las distancias interplanares registradas en el PDF 86-1199 para los planos cristalinos mencionados, recordando que, el patrón de puntos es una proyección en un plano del espacio de Fourier de la estructura cristalina de la HAp, y por ello, una distancia grande en la estructura cristalina corresponderá a una distancia pequeña en el espacio de Fourier y viceversa.

También, por medio del Digital se aplicó una máscara que bloqueó a los puntos más intensos del patrón, y con los restantes, se formó la imagen pequeña que aparece en la parte inferior derecha de la figura 4.8; por lo tanto, dicha imagen solo presenta el arreglo de líneas correspondiente a los planos (220).

En cuanto a la Figura 4.9, se puede observar un espaciamiento entre las líneas que van de arriba hacia abajo que es de 0.81 nm y que corresponde a los (100) y las líneas en la dirección de izquierda a derecha tienen un espaciamiento de 0.35 nm, las cuales se relacionan con los (002). Nuevamente, se aplicó una FFT a la región de la imagen contenida dentro del recuadro blanco y se obtuvo el patrón de puntos que se muestra en el recuadro superior derecho de la figura. El patrón de puntos está muy bien definido, ordenado y simétrico, presentando una simetría dos, lo anterior permite determinar claramente que la nanofibra de HAp tiene una alta calidad cristalina. Los puntos del patrón fueron indexados utilizando el PDF 86-1199 y se identificaron como se muestra en la figura. Tal como se hizo a la imagen de la figura 4.8, a la imagen de la figura 4.9 se le aplicó una máscara para bloquear

aquellos puntos correspondientes a la contribución de los planos (002) a la FFT, y con los puntos restantes se construyó la imagen que aparece en el recuadro inferior derecho de la figura; por ello, esta última imagen solo está formada por los planos (100).

Los planos cristalinos más abundantes que fueron encontrados tanto en las imágenes anteriores de HRTEM como en sus correspondientes FFT's, también fueron registrados por medio de la difracción de rayos X, lo cual confirma que la estructura cristalina de las nanofibras tiene una orientación cristalia preferencial en la dirección [300].

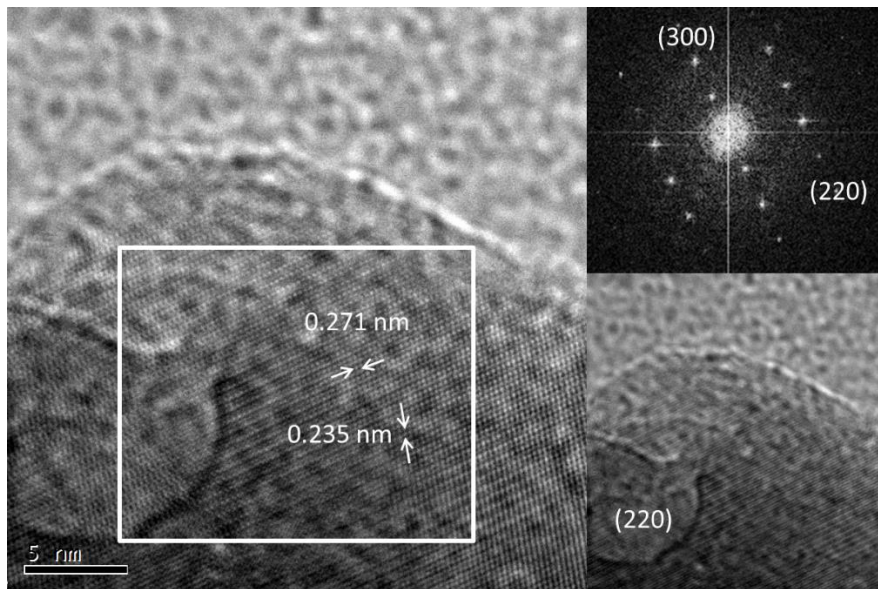


Figura 4.8 Micrografía de HRTEM de una nanofibra de HAp en donde se muestra el ordenamiento cristalino. El recuadro superior derecho es una FFT de la región de la imagen izquierda dentro del recuadro y la imagen inferior derecha, es el resultado de la aplicación de una máscara.

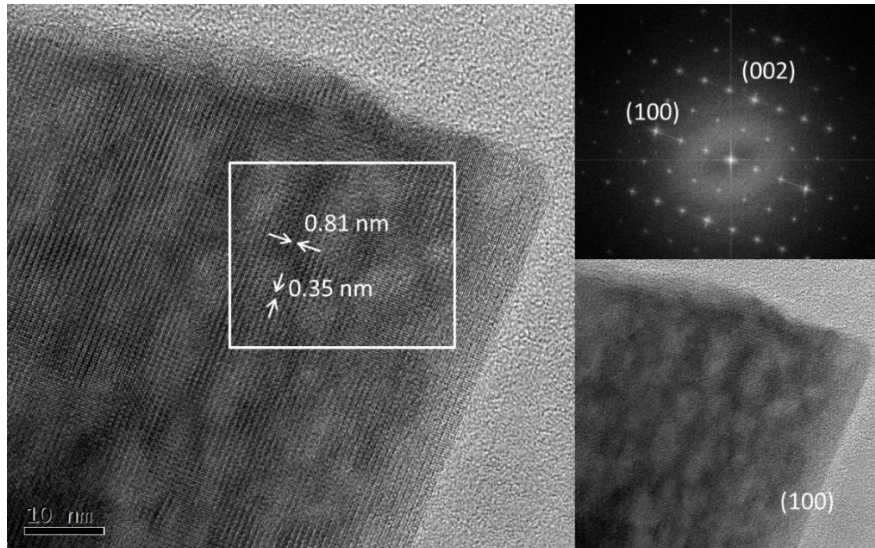


Figura 4.9 Micrografía de HRTEM de una nanofibra de HAp mostrando su ordenamiento cristalino. En el recuadro superior se presenta la FFT y debajo, la imagen generada únicamente con los planos (100).

4.6 Adsorción y desorción de nitrógeno.

Los poros dependiendo su tamaño se pueden clasificar en: microporos (tamaño <2 nm), ultramicroporos (tamaño <0.7 nm), mesoporos (2 nm <tamaño<50 nm), macroporos (tamaño >50 nm) (Sing, K.W. 1991).

La adsorción de nitrógeno a la temperatura de hervor (77 K) representa la técnica más utilizada para determinar el área de superficie del catalizador y para caracterizar su textura porosa. El punto de partida es la determinación de la isoterma de adsorción, es decir el volumen de nitrógeno adsorbido en contra de su presión relativa.

La forma isoterma depende de la textura porosa del sólido. Según la clasificación de la IUPAC seis tipos se pueden distinguir, en la siguiente isoterma se puede observar que presenta un sólido mesoporoso porque a presiones relativas bajas el proceso no difiere de lo que ocurre en los sólidos macroporosos y a presiones relativas altas la adsorción en mesoporos conduce a la formación de

varias capas hasta que, la condensación se lleva a cabo, dando un fuerte aumento del volumen de adsorción (Leofanti, G., *et. al.* 1998).

La isoterma (figura 4.10) tiene una parte reversible a bajas presiones relativas y un ciclo de histéresis a altas presiones relativas que corresponde a un ciclo de histéresis tipo H3. Este tipo de ciclo de histéresis es característico para agregados de partículas y aglomerado de partículas en forma de láminas generando poros con forma de incisión (Rouquerol, F., *et. al.* 1999). El alargamiento del ciclo de histéresis implica la presencia de poros de tamaño y forma no uniformes (Sing, K., *et. al.*, 1985).

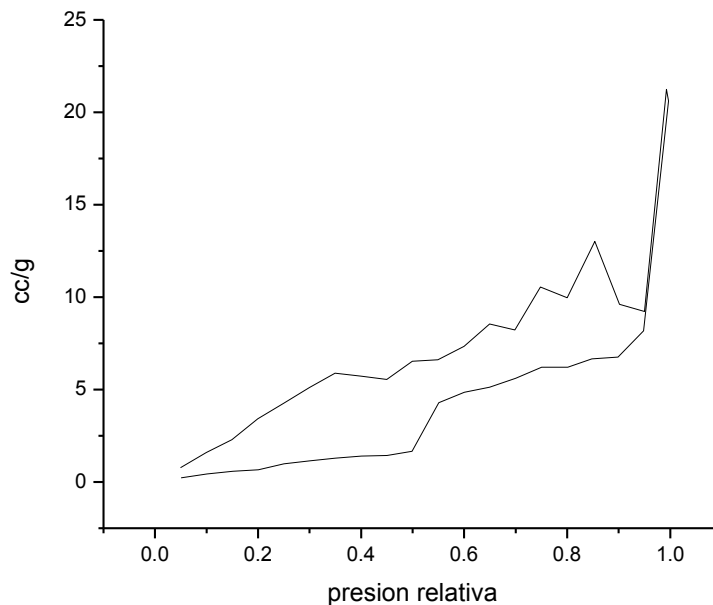


Figura 4.10 Isotherma del gel casting modificado.

Por otro lado en la Figura 4.10 se puede observar como la muestra presenta microporosidad (menor de 2 nm), mesoporosidad (2-50 nm) y macroporosidad (mayor a 50 nm); es importante mencionar que la micro y la macro porosidad se pueden observar pero no se pueden analizar correctamente ya que el equipo está

diseñado para medir mesoporosidad, es necesario hacer otro tipo de porosimetría para poder estudiar adecuadamente la micro y macro porosidad.

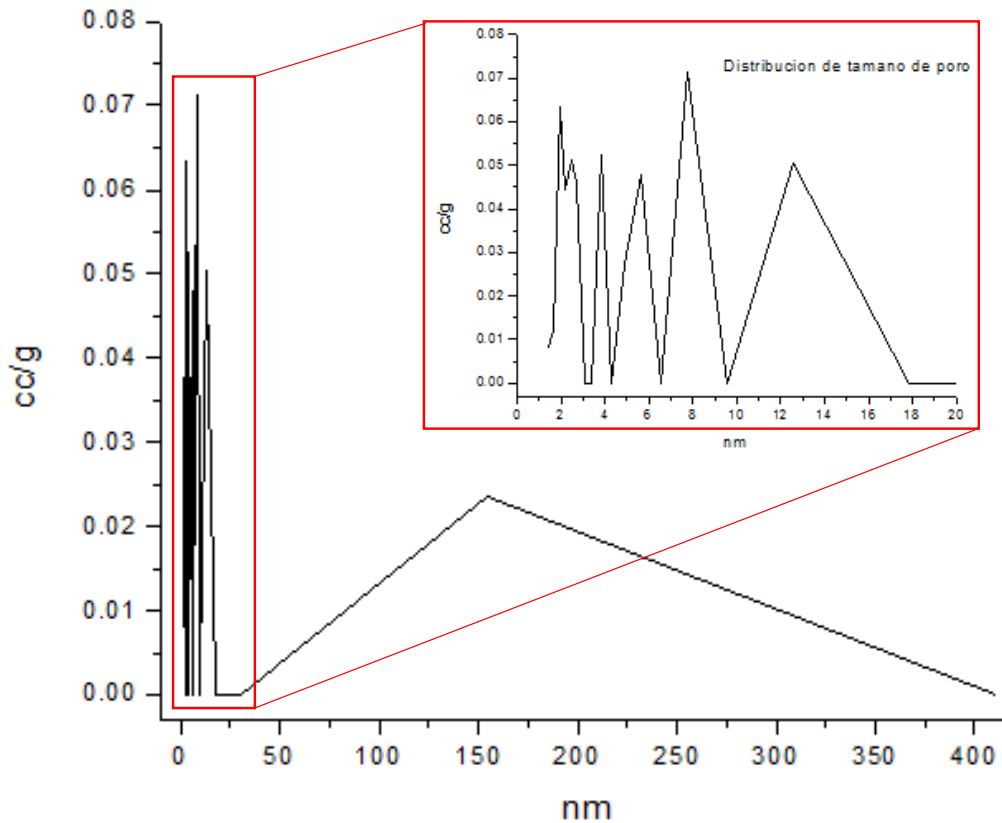


Figura 4.11 Distribución de tamaño de poro.

4.7 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría se llevó a cabo para saber la temperatura de desnaturalización de la fase orgánica ya que en la prueba de porosimetría (BET) se realizó una desgasificación a 80°C, el resultado de la prueba de calorimetría (figura 4.12) nos indica que la temperatura en la que se empieza a desnaturalizar la fase orgánica es a los 83.62°C es importante cuidar que la temperatura no rebase esta temperatura cuando se use la fase orgánica para que no se pierdan sus propiedades.

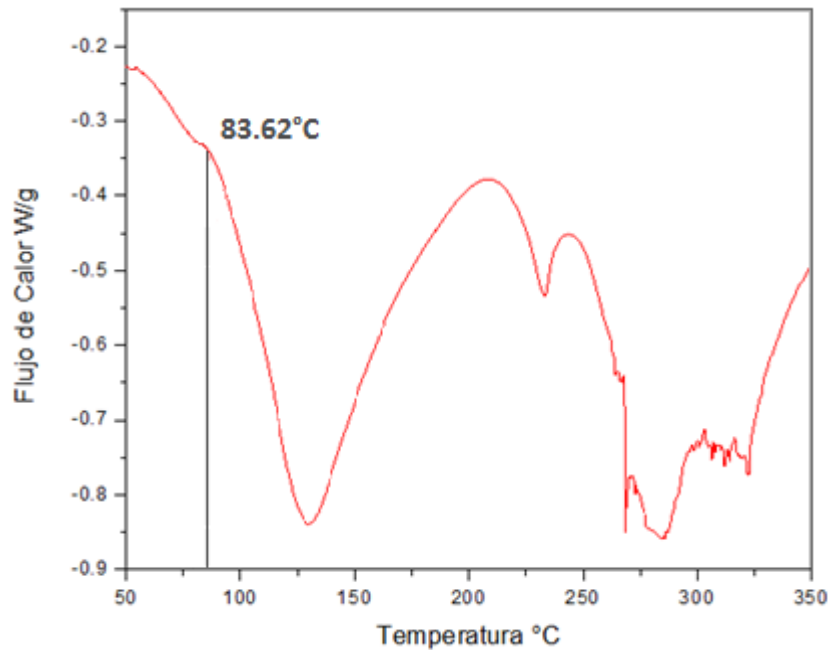


Figura 4.12 Calorimetría diferencial de barrido

4.8 Pruebas Mecánicas

Las propiedades mecánicas de un implante óseo deberían ser semejantes a las propiedades de los huesos receptores y así transferir adecuadamente la carga. Estas propiedades varían dependiendo del tipo de hueso. El esfuerzo máximo a la compresión varía entre 100 y 200 MPa para el hueso compacto y entre 2 y 20 MPa para el hueso trabecular. (Fu, Q., *et. al.* 2011).

Cuando se comprime un material celular, la curva esfuerzo-deformación presenta tres regiones (figura 4.13). A pequeñas deformaciones, la espuma se deforma de manera elástica lineal; después hay una meseta casi constante con la deformación, donde a muy pequeños esfuerzos hay grandes deformaciones, y finalmente hay una región de densificación cuando las celdas han colapsado y se aglomeran juntas (Ashby, M.F. y Hunkin. 2006).

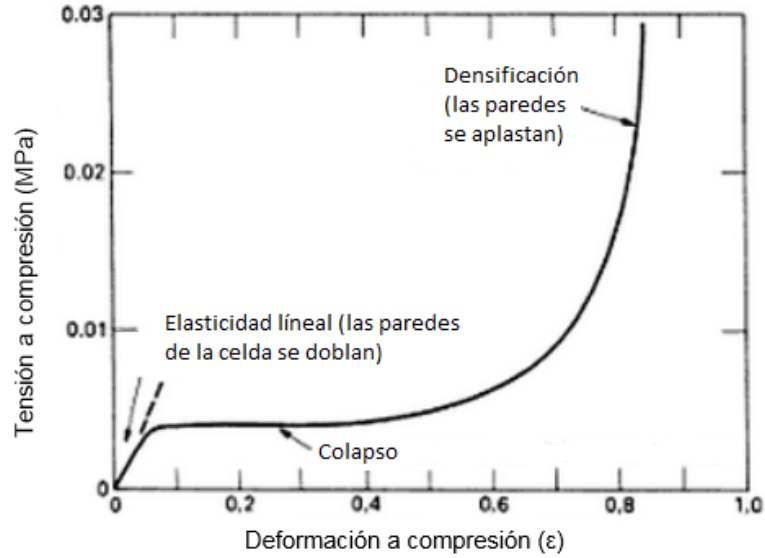


Figura 4.13 Curva esfuerzo-deformación a compresión para una espuma polimérica. (Ashby, M.F. y Hunkin. 2006).

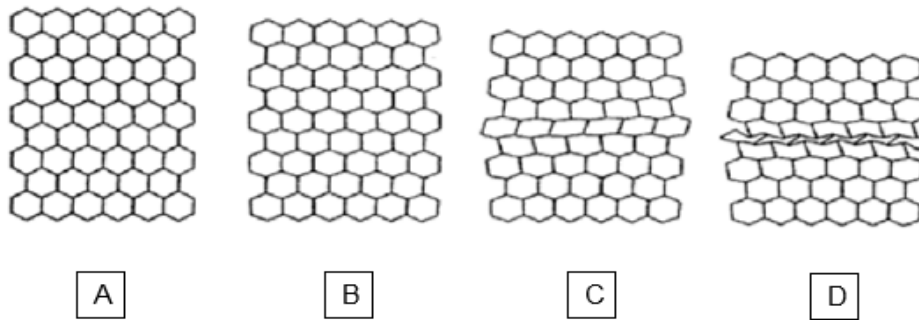
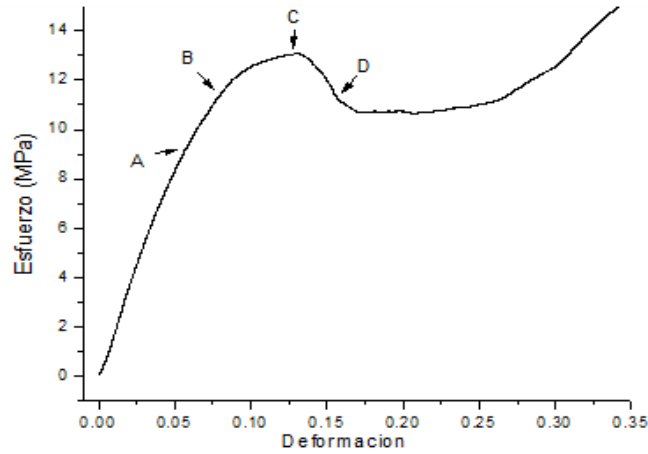


Figura 4.14 Esquema del comportamiento del material compuesto HAp-grenetina

En el esquema de la figura 4.14 se representan las etapas ocurridas durante el ensayo de compresión del material compuesto obtenido; estos materiales presentan las regiones descritas previamente de un material celular (figura 4.13).

En la zona A del esquema de la figura 4.14 las celdas del material soportan el esfuerzo aplicado sufriendo una deformación elástica, al llegar a la zona B cuando se presenta un cambio en la pendiente de la gráfica, éstas sufren una deformación plástica. El punto C es el esfuerzo máximo que soporta el material celular y posterior a este punto las celdas que constituyen el material comienzan a sufrir una deformación permanente. El colapso de las células se presenta en la región D ocasionando una densificación en el material.

En la figura 4.15 se observan los comportamientos promedio de las piezas moldeadas de HAp con las 3 concentraciones diferentes de grenetina que se añadieron. Es posible observar un incremento en dichos esfuerzos máximos en relación al aumento de colágeno como fase orgánica.

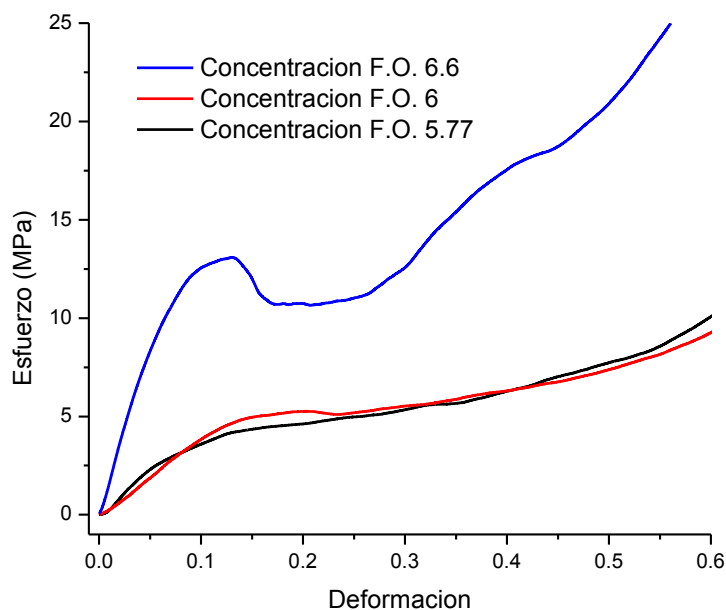


Figura 4.15 Grafica de esfuerzo-deformación.

Los valores de esfuerzo máximo para las diferentes concentraciones de grenetina fueron 4.17, 4.82 y 13.14 MPa respectivamente, estos esfuerzos corresponden a los requeridos por el hueso trabecular que son de entre 2 y 20 MPa.

Tabla 4-1 Tabla Comparativa de Esfuerzos Máximos

| Concentración de Fase Orgánica | Esfuerzo Máximo (Mpa) |
|--------------------------------|-----------------------|
| 6.3 | 1.58 |
| 8 | 2.9 |
| 10.8 | 8.5 |
| 14.9 | 13.5 |
| 19.5 | 14 |

| Concentración de Fase Orgánica | Esfuerzo Máximo (Mpa) |
|--------------------------------|-----------------------|
| 5.7 | 4.17 |
| 6 | 4.82 |
| 6.6 | 13.14 |

Con el fin de proporcionar un panorama más amplio de los valores obtenidos en la Tabla 4-1 se compara los valores de esfuerzo máximo obtenido en el proceso de gel casting con polvos de HAp y grenetina como fase orgánica (Izquierda) (Alonso, S. 2013) con los valores de esfuerzo máximo obtenidos en el presente trabajo (Derecha).

Se puede observar un significativo aumento en el esfuerzo máximo al usar HAp sintética en lugar de HAp en polvo, al comparar los esfuerzos máximos de concentraciones de fase orgánica similar podemos ver un aumento de 3 veces el valor obtenido con la HAp en polvo, también se puede observar como con la mitad de la fase orgánica utilizada por el otro método se alcanzan valores similares de esfuerzo máximo, se espera que de la misma manera que en el trabajo de gel casting por polvos el valor del esfuerzo máximo siga aumentando conforme se agregue fase orgánica.

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se sintetizaron nanofibras por el método hidrotermal asistido por microondas que demostró ser muy eficiente en tiempo y energía y con el cual se ha logrado obtener hasta ahora la orientación cristalina de las nanofibras en la dirección [300].

Además se obtuvo una relación Ca/P similar a la que presenta el hueso humano lo cual es deseado porque se ha demostrado que facilita la biocompatibilidad.

También se obtuvo micro y macro porosidad a través del proceso de gelcasting modificado; la micro y macro porosidad se debe analizar por otros métodos de porosimetría que sean los adecuados para cuantizar el tamaño de micro y macro poro, posteriormente, se le añadió una fase orgánica con el objetivo de sinergizar las propiedades mecánicas de las piezas cerámicas.

El esfuerzo máximo a la compresión obtenido fue de 13.14 MPa a baja concentración de fase orgánica, este esfuerzo corresponde a los requeridos por el hueso trabecular que son de entre 2 y 20 MPa. Se espera que con el uso de mayor cantidad de fase orgánica siga aumentando el esfuerzo máximo hasta el esfuerzo requerido por el hueso compacto.

Con los resultados obtenidos, es posible concluir que las nanofibras de HAP orientadas en "A" afectan favorablemente las propiedades mecánicas y que el material compuesto obtenido tiene propiedades fisicoquímicas, estructurales, morfológicas y mecánicas similares a las del tejido óseo natural con lo que es posible considerar el empleo de este tipo de material como reemplazo óseo.

6. REFERENCIAS

- Alvarez, P. 2009. Síntesis y caracterización de un material compuesto a base de hidroxiapatita con propiedades similares a la del tejido óseo natural. Tesis de Maestría, Querétaro, Qro.
- Alonso, S. 2013. Control de la macroporosidad de un material compuesto orgánico-inorgánico a base de hidroxiapatita: síntesis y caracterización. Tesis de Maestría, Querétaro, Qro.
- Arami, H., Mohajerani, M., Mazloumia, M., Khalifehzadeh, R., Laka, A. y Sadrnezhad, S.K. 2008. Rapid formation of hydroxyapatite nanostrips via microwave irradiation, Iran, *Journal of Alloys and Compounds* 469, 391–394.
- Ashby, M.F. y Hunkin. 2006. An introduction to microestructures, processing and design, D.R. de Engineering Materials 2. Great Britain, BH.
- Askeland, D. R., y Phulé P.P. 2001. Ciencia e Ingeniería de los Materiales, 4ta Edición, p 721.
- Beckhoff, B., Kanngießler, B., Langhoff, N., Wedell, R. y Wolff, H. 2006. Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis, Springer.
- Best, S., Porter, A., Thian, E. y Huang, J. 2008. Bioceramics: Past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society*, n° 28, pp. 1319-1327.
- Bose, S., Dasgupta, S., Tarafder, S. y Bandyopadhyay, A. 2010. Microwave-processed nanocrystalline hydroxyapatite: Simultaneous enhancement of mechanical and biological properties, Washington, USA, *Acta Biomaterialia* 6, 3782–3790
- Cabrera, J.L., Velázquez, R. y Rivera, E.M. 2011. Synthesis of Hydroxyapatite Nanostructures Using Microwave Heating, Qro., Mx., *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 11, 1 –7
- Campa, J., Ulloa, G. S, Bucio, L., Belío, I.A., Velázquez, R. y Rivera, E.M. 2007. Biomateriales. Fundamentos, Técnicas y Aplicaciones., Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.
- Chu, P.K. y Liu, X. 2008. Biomaterials Fabrication and Processing. Handbook, CRC Press
- Cordell, J.M., Vogl, M.L. y Wagoner A. J. 2009. The influence of micropore size on the mechanical properties of bulk hydroxyapatite and hydroxyapatite scaffolds. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, vol. 2, pp. 560-570.

- Fawcett, D. W. 1995. Tratado de Histología. Mc Graw Hill. Madrid, España.
- Fortoul, T. y Castell, A. 2013. Histología y Biología Celular. Mc Graw-Hill, 2da edición.
- Fu, Q., Saiz, E., Rahaman, M.N. y Tomsia, A.P. 2011. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. Review Materials Science and Engineering C, vol. 31, pp. 1245-1256.
- Geneser, F. 2000. Histología. Médica Panamericana, 3era edición.
- Goldstein, J. I., Newbury, D.E., Echlin, P., Joy, D.C., Fiori, C. y Lifshin, E. 1984. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis, New York, USA: Plenum Press.
- Goldstein, J.I., 2003. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis.
- Hench, L.L. 1991. Bioceramics; from concept to clinic, J. Am. Ceram. Soc., 74: 1487-1510.
- Hornez, J.C., Chai, F., Monchau, F., Blanchemain, N., Descamps, M. y Hildebrand, H. 2007. Biological and physico-chemical assessment of hydroxyapatite (HA) with different porosity. *Biomolecular Engineering*, vol. 24, pp. 505-509.
- Jansen, J.C., Arafat, A., Barakat, A.K. y Van Bekkum, H. 1992. Synthesis of Microporous Materials, vol. 1, Van Nostrand Reinhold, New York (NY), p. 507.
- Kremsner, J.M. y Stadler, A. 2013. A Chemist's guide to microwave synthesis. Basics, Equipment & Application Examples.
- LeGeros, R.Z., Parsons, J.R., Daculsi, G., Driessens, F., Lee, D., Liu, S.T., Metsger, S., Peterson, D. y Walker, M. 1988. Significance of the porosity and physical chemistry of calcium phosphate ceramics. Biodegradation-Bioresorption. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, nº 523, pp. 268-271.
- Leofanti, G., Padovan, M., Tozzola, G. y Venturelli, B. 1998. Surface area and pore texture of catalysts. *Catalysis Today* 41, p.p. 207-219.

- Londoño, M.E., Echavarría, A. y De La Calle, F. 2006. Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. *Escuela de Ingeniería de Antioquia*, nº 5, pp. 109-118.
- Ortega, M. 2001. Recambios protésicos de rodilla, Médica Panamericana.
- Park, J.B. 1984. *Biomaterials Science and Engineering*, Plenum Press, New York.
- Park, J.B. 2008. *Bioceramics: Properties, Characterizations, and Applications*. Nueva York, Springer;
- Riman, R.E., Suchanek, W.L., Byrappa K., Chen, C., Shuk, P. y Oakes, C.S. 2001. Solution synthesis of hydroxyapatite designer particulates, New Jersey, USA, *Solid State Ionics* 151, 393– 402.
- Rivera, E.M., Díaz, J., Rodríguez J.R. y Brostow, W. 2001. Hydroxyapatites spheres with controlled porosity for eye ball prosthesis: processing and characterization. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 12, pp. 305-3011.
- Rivera, E.M., Velázquez, R. y Rodríguez, R. 2003. Improvement in mechanical properties of hydroxyapatite objects with controlled porosity made by modified gelcasting process, Qro., Mx, *Materials Science Forum* 426-432, 4489-4494.
- Rivera, E.M., Velázquez, R. y Muñoz, P. 2007. Mechanical characterization of hydroxyapatite – based, organic-inorganic composites, Qro., Mx., *Materials Science Forum* 539-543, 583-588.
- Rivera, E.M., Velázquez, R., y Cabrera, J.L. 2010 Morphological Analysis de Hydroxyapatite Particles Obtained By Different Methods. *Materials Science Forum Vols. 638-642* pp 681-686.
- Rouquerol, F., Rouquerol, J. y Sing, K. 1999. *Adsorption by Powders and Porous Solids*. Academic Press, London.
- Ross, M.H. y Pawlina W. 2013. *Histología, Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular*, 6ta Edición, p 218-230.
- Siddharthan, A., Seshadri, S.K. y Sampath, T.S. 2006. Influence of microwave power on nanosized hydroxyapatite particles, India, *Scripta Materialia* 55, 175–178.
- Sing, K., Everett, D., Haul, R., Moscou, L., Perolti, R., Rouguerol, J. y Siemieniowska, T. 1985. *Pure Appl. Chem.* 57, 603.

- Sing, K.W., 1991. Characterization of Porous Solids II, en: F. Rodriguez-Reinoso et al. (Eds.), Elsevier, Amsterdam.
- Tortora, G. J. y Derrickson, B. 2006. Principios de Anatomía y Fisiología. Médica Panamericana. México, D.F.
- Tripathi, G. y Basu, B. 2011. A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. *Ceramics International*.
- Union Internacional de Cristalografía. 2012. Bragg's Law. Online dictionary of crystallography
- Vázquez, G. y Echeverría, O. 2000. *Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas*, México, Fondo de Cultura Económica.
- Zhang, F. Z., Kato, T., Fuji, M. y Takahashi, M. 2006. Gelcasting fabrication of porous ceramics using a continuous process. *Journal of the European Ceramic Society*. vol. 26, pp. 667-671.

7. ANEXO

7.1 Calentamiento por microondas

A diferencia del calentamiento convencional, el calentamiento por microondas calienta directamente el volumen de líquido, mientras que el entorno (recipientes) solo se calienta debido a la mezcla de reacción en caliente que producen. El calentamiento con microondas (ondas electromagnéticas con una frecuencia de 2,45 GHz) se basa en dos mecanismos:

Reorientación bipolar: Las moléculas con una estructura dipolar (por ejemplo, el agua) oscilan en un campo de microondas fluctuante. Esta oscilación genera un movimiento molecular que da como resultado la fricción y, por lo tanto, el calor.

Conducción iónica: Las moléculas con una estructura iónica (por ejemplo, las sales) se alinean en el campo electromagnético. Esta alineación también genera un movimiento molecular que da como resultado la fricción y, por lo tanto, el calor. (Kremsner, J.M. y Stadler, A., 2013)

7.2 Preparación de los viales

Para la preparación de los viales es necesario mantenerlo en forma vertical y agregar la cantidad necesaria al vial (Figura 7.1) sin pasar el límite de volumen permitido en el vial. Una vez llenados se abren las tapas de los viales (Figura 7.2) cuidadosamente con el dispositivo para el sellado (Figura 7.3) y se abre el tornillo de ventilación, después se coloca la tapa sellando el vial a presión, finalmente se cierra el tornillo de ventilación y se coloca en el rotor.



Figura 7.1 Vial de cuarzo



Figura 7.2 Tapa del vial



Figura 7.3 Dispositivo para el sellado del vial

7.3 Funcionamiento del difractómetro

El fenómeno de difracción es debido a la relación entre las fases de todas las ondas reflejadas por cada celda unidad del cristal, las diferencias de camino óptico entre los rayos que han atravesado distintos puntos del cristal, que a su vez producen un cambio en la amplitud de la onda resultante. Cuando las ondas están completamente desfasadas se anulan entre sí. Por el contrario, cuando las ondas están en fase, la amplitud de la onda final es la suma de las amplitudes para cada onda. Puesto que un cristal está compuesto de miles de celdas unidad, la interferencia constructiva entre todas ellas llega a resultar en un haz lo suficientemente intenso para ser medido con un detector de rayos X.

La condición para que las ondas estén en fase es que la diferencia de sus caminos ópticos sea cero o un múltiplo entero n de la longitud de onda. En un cristal, la diferencia en el camino óptico entre átomos situados en posiciones equivalentes en distintas celdas unidad es $2d \sin\theta$ donde d es la distancia entre los planos imaginarios que unen los puntos equivalentes de la red cristalina. Es decir, para que se observe interferencia constructiva de rayos X a un ángulo de observación 2θ , se debe cumplir la expresión conocida como Ley de Bragg (Figura 7.4): $n\lambda = 2d \sin\theta$. Donde n es un número entero, λ es la longitud de onda de los rayos-X, d es la distancia entre los planos de la red cristalina y θ es el ángulo entre los rayos incidentes y los planos de dispersión. (Union Internacional de Cristalografía, 2012).

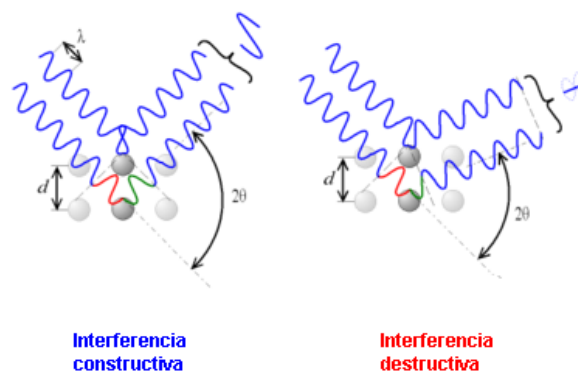


Figura 7.4 Ley de Bragg

7.4 Principios del análisis por EDS

- a) El detector genera un pulso de carga proporcional a la energía del rayo X.
- b) Este pulso se convierte en voltaje.
- c) La señal se amplifica a través de un transistor (FET), se aísla de otros pulsos, se vuelve a amplificar y se identifica electrónicamente como proveniente de un rayo X con una energía específica
- d) La señal digitalizada se almacena en un canal asignado a esa energía en el analizador multicanal.

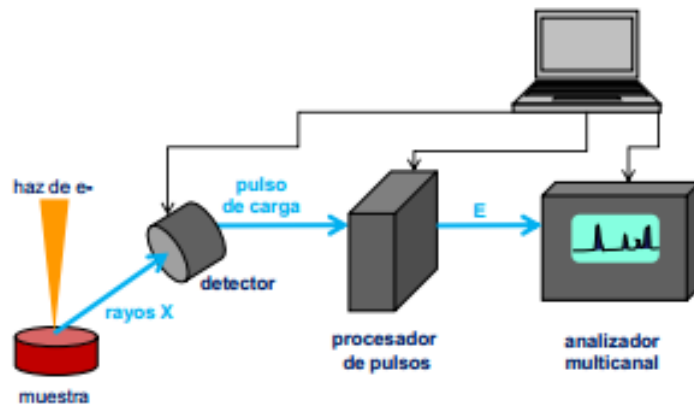


Figura 7.5 Diagrama de análisis por EDS

El espectrómetro entonces realiza dos funciones: Detecta los rayos X y los separa (dispersa) en un espectro según su energía.

7.5 Principio físico de la fluorescencia de rayos X

Al exponer un material a rayos X de longitudes de onda cortas o a rayos gama, pueden ionizarse los átomos que constituyen el material. La ionización consiste en eyección de uno o más electrones desde el átomo. Puede ocurrir si a éste se le expone a radiación cuya energía exceda la del potencial de ionización.

Tanto los rayos X como los rayos gama pueden ser suficientemente energéticos para desprender electrones fuertemente ligados en los orbitales

internos del átomo. Tal remoción electrónica deja en condición inestable a la estructura electrónica del átomo, y los electrones de orbitales más elevados «caen» hacia el orbital más bajo, que luego ocupan los huecos de los electrones internos desprendidos.

En esta caída, o transición, se genera energía mediante emisión de un fotón. El valor de la energía de este corpúsculo es igual a la diferencia de energía entre los dos orbitales involucrados. Por lo tanto el material emite radiación cuya energía es característica de los átomos componentes del material. El término fluorescencia se usa para denominar el fenómeno por el cual la absorción de radiación de una energía específica genera reemisión de radiación de una energía diferente, generalmente menor.

7.6 Funcionamiento del microscopio electrónico de transmisión

El microscopio electrónico de transmisión es un instrumento que utiliza como fuente de iluminación un haz de electrones que son generados por un filamento de tungsteno cuando este por efecto termoiónico se pone incandescente. Estos electrones son acelerados y dirigidos hacia la muestra mediante lentes electromagnéticas en condiciones de alto vacío.

Existen diferentes modos de formación de la imagen en un microscopio de transmisión: si la imagen se forma a partir del haz transmitido, que no ha sufrido dispersión, entonces la imagen del objeto es oscura sobre un fondo brillante. Si, por el contrario, se utilizan los electrones dispersados en este caso la imagen aparece brillante sobre un fondo oscuro. Por ello estas dos técnicas se denominan formación de imagen en campo claro y en campo oscuro respectivamente, la primera es la más utilizada.

Por otra parte con este microscopio se puede obtener un diagrama de difracción de la muestra, lo que nos aporta una valiosa información sobre la estructura cristalina de la misma. Esto es posible si hacemos incidir el haz de electrones sobre un cristal con un ángulo capaz de satisfacer la ley de Bragg para

una determinada distancia entre planos atómicos d_{hkl} . Ya que la longitud de onda de los electrones es muy pequeña ese ángulo también lo es por lo que el haz debe incidir prácticamente paralelo a los planos reticulares. El diagrama de difracción está formado por los puntos de corte de los haces difractados y transmitido con el plano de la pantalla. Representa, por tanto, la sección de la red recíproca del cristal en el plano normal al haz de electrones. La posibilidad de combinar la difracción de electrones con los distintos modos de formación de la imagen hace del microscopio de transmisión una de las mejores herramientas en el estudio de la red cristalina y sus defectos.

De arriba a abajo, el TEM (Figura 7.6) consiste en una fuente de emisión, que puede ser un filamento de tungsteno o bien una fuente de hexaboruro de lantano (LaB_6). Conectando dicho cañón a una fuente de alto voltaje ($\sim 120\text{kV}$ para muchas aplicaciones) comenzará a emitir electrones hacia el vacío. Esta extracción de electrones suele reforzarse con la ayuda de un cilindro Wehnelt. Una vez extraídos, las lentes de la parte superior del TEM manipulan los haces de electrones permitiendo su focalización al tamaño deseado y su localización sobre la muestra.

La manipulación de los electrones se consigue mediante la combinación de dos efectos físicos. La interacción de los electrones con un campo magnético hace que estos se muevan de acuerdo a la fórmula vectorial $F = (q \cdot v) \times B$ (siendo v y B , el vector velocidad del electro, B el vector campo magnético y " \times " el producto vectorial). Este efecto permite que los electrones emitidos puedan ser manipulados por medio de electroimanes. Esta técnica permite la formación de una lente magnética de distancia focal variable, dependiendo de la distribución del flujo magnético.

Las lentes del TEM permiten realizar la convergencia de los haces y el control del ángulo de la misma. Dicho control se ejerce modificando la cantidad de corriente que fluye a través de las lentes cuadrupolares y hexapolares y permite modificar los aumentos del TEM.

Típicamente un TEM contiene tres conjuntos de lentes con muchas posibles variantes en la configuración de las lentes. Los conjuntos se denominan respectivamente lentes condensadoras, lentes de objetivo y lentes de proyección. Las lentes condensadoras se encargan de la formación inicial del haz tras la emisión de los electrones. Las lentes de objetivo focalizan el haz sobre la muestra y finalmente las lentes de proyección se encargan de expandir el haz reflejado hacia la pantalla de fósforo u otro dispositivo de visualización tal como película. Los aumentos del TEM vienen dados por la razón de las distancias entre la muestra y el plano imagen del objetivo.

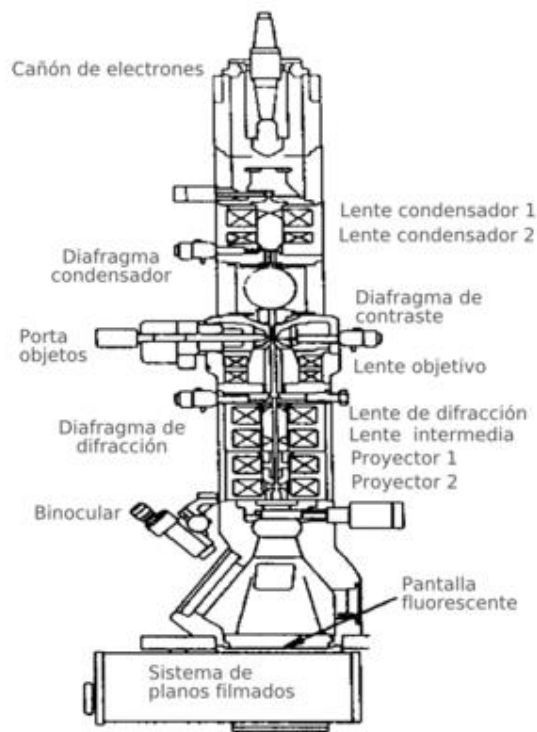


Figura 7.6 Esquema de un microscopio electrónico de transmisión

Para conseguir el flujo ininterrumpido de electrones, el TEM debe operar a bajas presiones, típicamente en el orden de 10^{-4} a 10^{-8} kPa. La necesidad de esto se debe a dos razones: primero, permitir una diferencia de voltaje entre el cátodo y tierra sin que se produzca un arco voltaico. Segundo, reducir la frecuencia de las colisiones de los electrones con los átomos del aire a niveles despreciables.