



8Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería

**Elaboración de un material compuesto Quitosano-HAp con aplicaciones
potenciales en la regeneración de tejido óseo**

Opción de titulación
Tesis

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

Presenta:

Ricardo Pascual Alanis 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

Dr. J. Gabriel Luna Bárcenas
Suplente

Firma

Dr. Manuel Toledano Ayala
Director de la Facultad

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

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Mayo 2019
México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Elaboración de un material compuesto
Quitosano-HAp con aplicaciones potenciales en la
regeneración de tejido óseo

por

Ricardo Pascual Alanis Gomez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: IGMAC-266696

RESUMEN

El quitosano (CS) es un material prometedor para la regeneración de tejidos. 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. El objetivo principal de este trabajo es sintetizar y caracterizar nanocompuestos CS-HAp, con diferentes relaciones de porcentaje en peso (wt. %) para obtener un nanocompuesto con las mejores propiedades mecánicas. Los nanocompuestos se sintetizaron por el método de evaporación de solventes. También el presente trabajo describe la obtención de nanoestructuras de HAp con morfología controlada a través de la síntesis hidrotermal asistida por microondas, las muestras se analizaron por medio de difracción de rayos X de polvos (XRD), fluorescencia de rayos X, microscopía electrónica de barrido de (SEM), espectroscopia FTIR. 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, quitosano, nanotecnología)

SUMMARY

Chitosan (CS) is a promising material for tissue regeneration. Hydroxyapatite-based biomaterials (HAp) are frequently studied due to the favorable response they present when used for the replacement of bone tissue. In order for the HAp to be used as a replacement for human bone tissue, it is important that it has a morphology, size and chemical composition similar to that shown by being present in said tissue, thus obtaining a greater probability of acceptance by the recipient organism. In addition, the bone replacement material must possess mechanical properties similar to hard tissue, such as elasticity, resistance to compression and flexibility; in this way the individual who has received an implant of this type, will be able to carry out common daily activities. The main objective of this work is to synthesize and characterize CS-HAp nanocomposites, with different ratios of weight percentage (wt.%) To obtain a nanocomposite with the best mechanical properties. The nanocomposites were synthesized by the solvent evaporation method. The present work also describes the obtaining of nanostructures of HAp with controlled morphology through the hydrothermal synthesis assisted by microwaves, the samples were analyzed by means of powder X-ray diffraction (XRD), X-ray fluorescence, scanning electron microscopy of (SEM), FTIR spectroscopy. Likewise, the samples of composite material were made a study of their resistance to compression by means of a universal mechanical testing machine.

(Keywords: Biomaterial, hydroxyapatite, chitosan, nanotechnology)

Esta tesis está dedicada especialmente a Dios sin el nada de esto es posible

A mis padres, gracias por darme el apoyo y la motivación para siempre seguir adelante, gracias por amarme incondicionalmente y gracias por siempre poner todo su esfuerzo para que su hijo consentido salga adelante

A mis hermanos, que aunque a veces nos molestemos siempre estamos el uno al otro, gracias por siempre apoyarme

A majo, mi amoi, la pichanch, gracias por estar a mi lado y por siempre impulsarme a ser mejor cada día

A mis abuelitos , gracias por ser parte de mí y por siempre darme el cariño y las bendiciones en todo momento, están siempre en mi mente

A todo mis familiares en especial a mi tía Paty que siempre le hace como segunda madre, gracias por su amor

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 Velazquez Castillo, Dr. Eric Mauricio Rivera Muñoz, Dr. Rufino Nava Mendoza, Dr. Eduardo Elizalde Peña y Dr. Gabriel Luna Barcenas) por todo su tiempo, sabiduría y comentarios

A mis maestros de posgrado el Dr. Rodrigo Velazquez , el Dr. Rufino Nava , la Dra. Ángeles Cuan , el Dr. Carlos Cortez , la Dra. Janet Ledesma , y a la Dra. Lucero Gomez por sus valiosas enseñanzas.

A la Dra Beatriz Millan Malo de CFATA UNAM por su apoyo en difracción de rayos x realizadas en, a M, a la Dra. Maria Antonieta Mondragon Sosa de CFATA UNAM por su apoyo en espectros microoraman, al M.en C. Guillermo Vazquez Sanchez y M. en I. Gerardo Fonseca de CFATA UNAM por su apoyo en pruebas mecánicas, a la M. en .I Alicia Del Real Lopez de CFATA UNAM por su apoyo en Sem, y en especial a Carmen Peza Ledesma por sus valiosas enseñanzas en la interpretación de resultados y apoyo técnico en la preparación de muestras.

Al Q. En A. Martin Adelaido Hernandez Landaverde, por su valioso apoyo en las mediciones de difracción de rayos x, a la M.en C. Reina Araceli Mauricio Sanchez por su apoyo en la aplicación de la metodología para la obtención de los materiales, así como en las mediciones de espectroscopia infrarroja.

Al M en C Javier Villarreal Castellon, por su apoyo en la síntesis de los materiales

Tabla de contenido

1. Capitulo 1.INTRODUCCIÓN.....	112
2. Capitulo 2 MARCO TEÓRICO.....	..ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2.1 BIOMATERIAL.....	13
2.2 MATERIAL COMPUESTO	13
2.3 TEJIDO ÓSEO.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2.3.1. FASE INORGÁNICA.....	20
2.3.2. FASE ORGÁNICA.....	24
3. Capitulo 3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
3.1 HIPÓTESIS.....	26
3.2 OBJETIVO GENERAL:.....	26
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	26
4. Capitulo 4 METODOLOGÍA	29
4.1 SÍNTESIS DE HIDROXIAPATITA.....	28
4.2 SÍNTESIS DE PELICULAS CS- HAP	32
4.2.1. DIFRACCIÓN DE RAYOS X POR POLVOS	32
4.2.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRASFORMADA DE FOURIER(FTIR).....	34
4.2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).....	35
4.4.3. PRUEBAS MECÁNICAS.....	36
5. Capitulo 5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
5.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS X POR POLVOS (XRD).....	39
5.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	45
5.3 RAMAN	48
5.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).....	53
5.8 PRUEBAS MECÁNICAS.....	58
6. Capitulo 6 CONCLUSIONES	59
7. Capitulo 7 REFERENCIAS	62
8. ANEXO	66

8.1	CALENTAMIENTO POR MICROONDAS	66
8.2	PREPARACIÓN DE LOS VIALES	66
8.3	FUNCIONAMIENTO DEL DIFRACTOMETRO	68
8.4	PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS POR EDS.....	70
8.5	PRINCIPIO FÍSICO DE LA FLUORESCENCIA DE RAYOS X.....	69
8.6	FUNCIONAMIENTO DEL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN.....	70

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla

1-1	Porcentaje en peso y volumen de los componentes de la matriz ósea.	18
1-2	Tabla comparativa del esmalte dental, dentina, hueso e hidroxiapatita sintética	20
1-3	Técnicas de preparación de hidroxiapatita	23
4-1	Modulo de young elastico y esfuerzo maximo para los diferentes materiales compuestos	Error! Bookmark not defined.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

2.1	Estructura de un hueso largo típico.....	15
2.2	Representación esquemática de las células asociadas con el hueso	16
2.3	Gráfica de distribución de los componentes del tejido óseo.....	18
2.4	Estructura del Calcio tipo 1 y Calcio tipo 2.....	20
2.5	Estructura del fosfato y el hidróxido.....	21
2.6	Simulación grafica de la hidroxiapatita.....	21
2.7	Interacción del calcio tipo 2 con el grupo OH y los grupos PO_4^{-3}	22
2.8	Desacetilacion de la quitina.....	24
4.1	Microondas Synthos 3000 con rotor XQ-80.....	28
4.2	Vial de Cuarzo con chaqueta para rotor XQ-80.....	29
4.3	Hidroxiapatita sintetizada por el metodo hidrotermal asistido por microondas	30

4.4	Agitación de quitosano en polvo con 99% de ácido acético 1 v/v.....	31
4.5	Sonicador con punta ¼ para la solución de quitosano-HAp.....	32
4.6	Difractómetro de Rayos X por polvos.....	33
4.7	Medidas del cortador de la norma ASTM D638 para películas delgadas.....	37
4.8	Cortador para películas poliméricas delgadas.....	37
5.1	Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6390L.....	38
5.2	Difractograma de HAp comercial [Sigma Aldrich] y sintetizada por el método hidrotermal asistido por microondas y usando Ácido Glutámico como orientador...	39
5.3	Difractograma de HAp comercial de origen humano.....	40
5.4	Difractogramas obtenidos de las diferentes mezclas de Cs- HAp, conteniendo HAp comercial o sintética, con concentraciones de 5%, 10% y 20% en peso. Nótese la diferencia en la cristalinidad de la HAp.....	41
5.5	Espectro Infrarrojo de películas CS-HAp (Intervalo 4000-0 cm ⁻¹).....	45
5.6	Espectros de Infrarrojo de películas CS-HAp (Intervalo 1750-1200 cm ⁻¹).....	46
5.7	Espectro Infrarrojo de películas CS-HAp (Intervalo 1200-900 cm ⁻¹).....	47
5.8	Espectros Raman de las películas CS-HAp comercial con diferentes concentraciones de HAp.....	48
5.9	Espectros de Raman de las películas CS-HAp con HAp de nanofibra a diferentes concentraciones.....	49
5.10	Micrografía de SEM de las partículas de HAp comercial.....	51
1.11	Micrografía de SEM en la que se muestran las nano fibras obtenidas por el método hidrotermal asistido por microondas.....	52
5.12	Micrografía a mayor amplificación de una fibra de HAp mostrando su perfil hexagonal.....	54

5.13 Micrografías de SEM de las películas de quitosano con HAp comercial con concentraciones de a) 5, b) 10 y c) 20% en peso.....	55
5.14 Micrografías de SEM de las películas de quitosano con HAp sintética concentraciones de a) 5%, b) 10% y c) 20% en peso.....	56
5.15 Graficas de esfuerzo vs deformación en tensión para las películas de quitosano puro y conteniendo diferentes concentraciones de HAp comercial.....	58
5.16 Graficas de esfuerzo vs deformación bajo tensión de las películas de quitosano pura y con diferentes contenidos de nanofibras de HAp.....	59
7.1 Vial de cuarzo.....	67
7.2 Tapa del vial.....	67
7.3 Dispositivo para el sellado del vial.....	67
7.4 Ley de Bragg.....	69
7.5 Diagrama de análisis por EDS.....	69
7.6 Esquema de un microscopio electrónico de transmisión.....	72

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

El hueso natural consiste en aproximadamente 60% en peso de fase mineral, 30% en peso de fibra orgánica y 10% en peso de agua [1]. La fase mineral principal del hueso natural son los cristales de hidroxiapatita (HAp) con dimensión de 30-200 nm [2]. Un material óseo artificial ideal debe tener excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad controlable, microestructura adecuada, buenas propiedades mecánicas y eléctricas. 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.

Desde hace muchos años, la obtención de HAp sintética ha sido objeto de estudio de varios investigadores; La razón principal es que la HAp es un material bioactivo y tiene una composición química similar a la del componente inorgánico de los tejidos óseos naturales [3].

La HAp puede ser sintetizada, por medio de diferentes rutas químicas utilizando soluciones precursoras sometidas a altas condiciones de presión y temperatura, obteniendo materiales con propiedades físicas y químicas diversas, y características morfológicas controladas, además de alta pureza, composición homogénea y tamaños de partícula nanométricos [4].

Para esta tesis se usó el método hidrotermal asistido por microondas por ser 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 [5].

Como material orgánico con frecuencia se usan polisacáridos naturales como el quitosano (CS) debido a su biocompatibilidad y propiedades antimicrobianas. El quitosano, como polielectrolito, es capaz de formar complejos en condiciones

ácidas: los grupos reactivos $-NH_2$ y OH están implicados en interacciones específicas y forman una cadena química que se une con otros materiales como nanopartículas, nanotubos, proteínas, ADN, algunos polímeros, etc. [6]. Tal estructura con las valiosas propiedades fisicoquímicas del quitosano y sus nanocompuestos, su interacción no tóxica con proteínas, células y organismos vivos, hacen que este biomaterial sea muy atractivo para usos biomédicos, especialmente en la ingeniería de tejidos.

La descripción detallada de este trabajo se encuentra dividida por capítulos en donde inicia el Capítulo 2, donde se presentan algunos antecedentes y fundamentos necesarios para el entendimiento de los procesos y caracterizaciones que se llevaron a cabo. En el Capítulo 3 se aborda la justificación e hipótesis de este trabajo, así como los objetivos, general y específicos. La metodología y materiales utilizados para la síntesis de los nanocompuestos se detallan en el Capítulo 4. Los resultados de la investigación se presentan en el Capítulo 5, junto con las conclusiones en el capítulo 6.

Esta investigación consiste en la síntesis de un material compuesto a base de Hap-CS con diferentes relaciones de porcentaje en peso (wt. %), la Hap-CS que se utilizó para la síntesis fue analizada por Rayos X, Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Espectroscopía FTIR, tanto como resistencia a la compresión por medio de una máquina universal de pruebas mecánicas.

Capítulo 2. MARCO TEÓRICO

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.

2.1 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 puede ser definido como cualquier material usado para fabricar dispositivos para reemplazar una parte o una función del cuerpo de una manera segura, fiable, económica y fisiológicamente aceptable la cual es "una sustancia sistémica y farmacológicamente inerte diseñada para implantación dentro o incorporación con sistemas vivos"[6].

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 distinción que se hace de un biomaterial con respecto a cualquier otro material se refiere principalmente a la capacidad de permanecer y funcionar en un ambiente biológico sin causar ningún daño a su alrededor y sin que este se dañe en el proceso. Esta distinción se describe generalmente bajo el concepto de biocompatibilidad, en el cual hay que resaltar tres atributos importantes, que son: compatibilidad bioquímica (ausencia de toxicidad, inflamación excesiva o carcinogénica), compatibilidad biomecánica (rigidez adecuada) con el tejido circundante, y adhesión biológica en la interfase de contacto material-tejido [6], [7].

2.2 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 [8].

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.

Un material compuesto se convierte en un nanocompuesto cuando al menos uno de sus componentes se encuentra del tamaño de nano escala, donde la dimensión de una unidad básica es menor igual a 100nm en al menos una dirección. Reducir el tamaño de uno de los componentes incrementa el área superficial y mejora la cohesión entre los componentes [9]. Actualmente los nanocompuestos de biopolímeros y materiales cerámicos bioactivos se han usado extensivamente en la ingeniería de tejidos y son uno de los mejores enfoques para preparar hueso artificial. Debido a sus propiedades el biopolímero natural quitosano es un excelente candidato para la regeneración de tejido óseo puesto que mejora su formación tanto in vitro como in vivo [10]. Este biopolímero se describe detalladamente mas adelante.

2.3 Tejido Óseo

El tejido óseo representa la parte principal del esqueleto, es un material relativamente liviano, de gran dureza y resistencia, pero también con cierta elasticidad. Estas propiedades le confieren especial aptitud como material esquelético. El tejido óseo es una forma especializada del tejido conectivo denso que se compone de células y una matriz extracelular. La dureza surge de la calcificación de la matriz extracelular [11].

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 2.1 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 [12].

La matriz ósea es metabólicamente activa y se conforma en alrededor de 65% de fase mineral y un 35% de fase orgánica. La fase inorgánica se compone en su mayoría por cristales de HAp y carbonato de calcio, mientras que la fase orgánica es principalmente colágeno. Las fibras de colágeno se ubican entre estos cristales lo que conforma un nanocompuesto híbrido, cuya estructura otorga el balance de rigidez flexibilidad y resistencia [13], [14].

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 secreta 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).

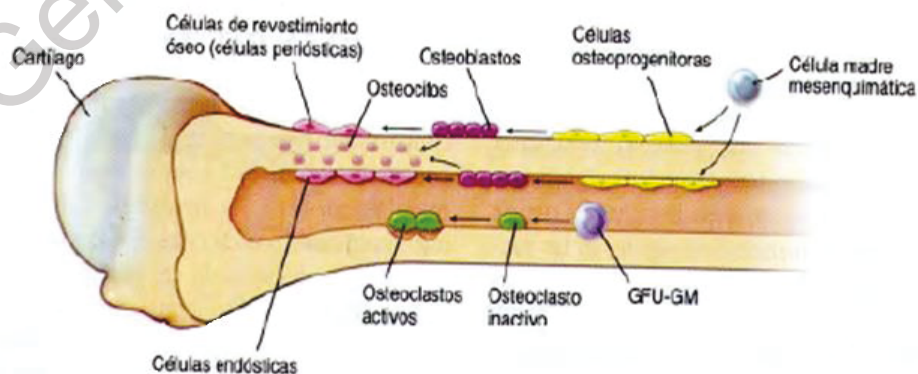


Figura 2.2 Representación esquemática de las células asociadas con el hueso (Ross y Pawlina 2013).

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).

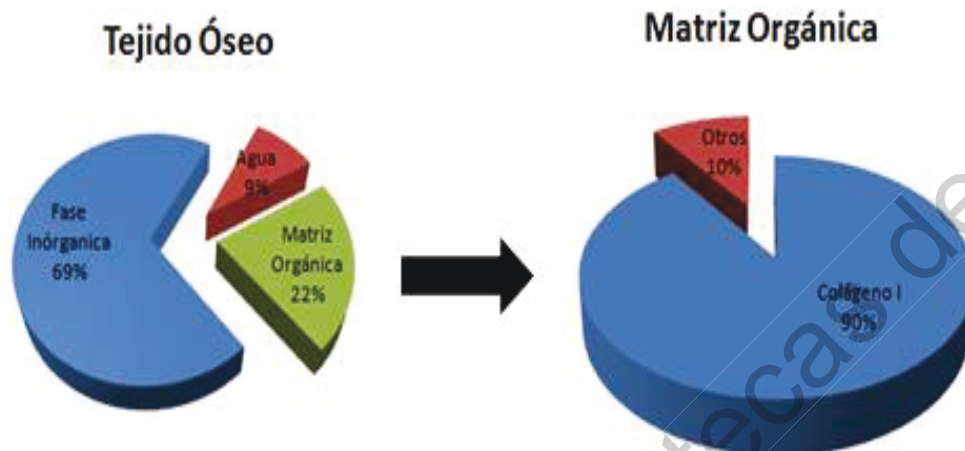


Figura 2.3 Gráfica de distribución de los componentes del tejido óseo.

Tabla 2-1 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 Morfogenética Ósea		
Agua	10	22	

2.3.1 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 2-2 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).

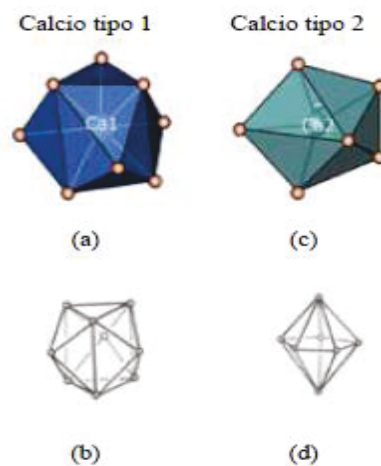


Figura 2.4 Estructura del Calcio tipo 1 y Calcio tipo 2. (Campa, *et. al*, 2007).

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)

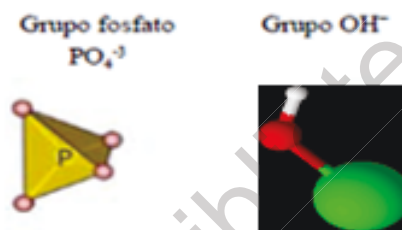


Figura 2.5 Estructura del fosfato y el hidróxido. (Campa, et. al, 2007).

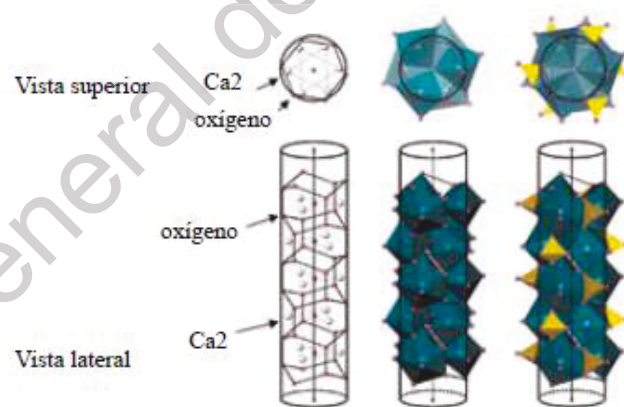


Figura 2.6 Simulación grafica de la hidroxiapatita. (Campa, et. al, 2007).

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 bpirámides pentagonales con el vértice de una pirámide sobre el eje del cilindro y cuatro de los siete aniones de la bpirámide 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 bpirámide 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 bpirámides 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).

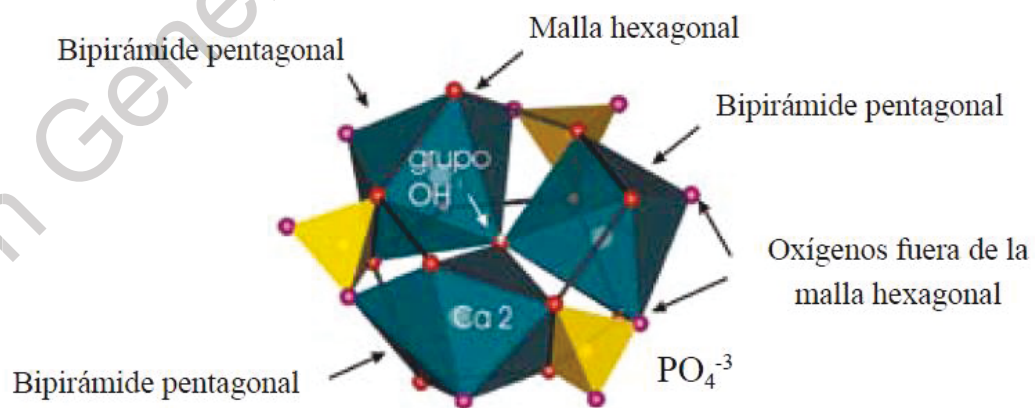


Figura 2.7 Interacción del calcio tipo 2 con el grupo OH^- y los grupos PO_4^{3-} . (Campa, *et. al*, 2007).

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 2-3 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 irregulares e inhomogéneos.
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 cristalinidad.
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 diferentes 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.

2.3.2 Fase Orgánica

El quitosano es un polisacárido natural obtenido por desacetilación parcial o total de la quitina (Figura 1). El quitosano es el derivado N-desacetilado de la quitina, un polisacárido lineal y semicristalino compuesto por unidades glucosamina y N-acetil glucosamina unidas por enlaces glicosídicos β - (1 \rightarrow 4). Cuando la fracción de unidades de glucosamina es superior al 50%, el polímero se denomina comúnmente quitosano y el número de unidades de glucosamina se denomina grado de desacetilación (DDA). La quitina, por otra parte, es el término que se da cuando las unidades de N-acetil glucosamina son mayores al 50% y el número de grupos acetamido se denomina grado de acetilación(DA) [18]. El quitosano presenta propiedades especiales tales como: viscosidad, solubilidad en varios medios, mucoadhesividad, formación de polioxisales, se comporta como un polielectrolito, capacidad para formar películas, quelante de metales, características ópticas y estructurales [19].

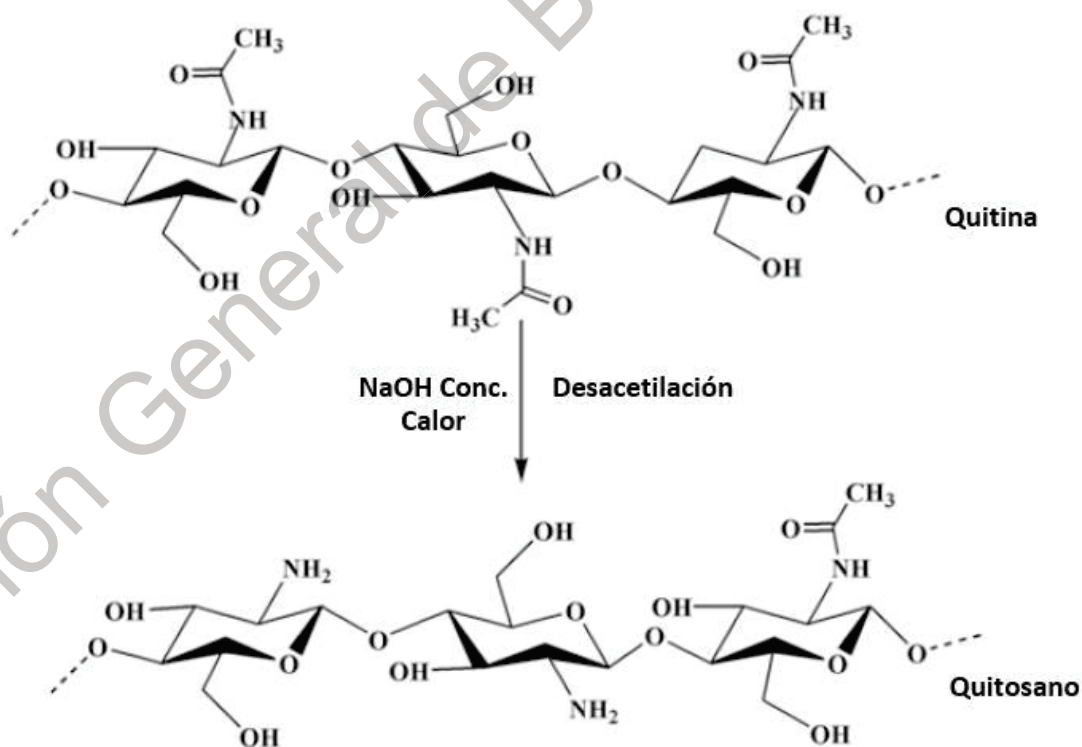


Figura 2.8 Desacetilacion de la quitina

El quitosano es un polímero policatiónico que tiene un grupo $-NH_2$ y dos $-OH$ en todos y cada uno de los residuos glucosídicos. Debido a la presencia de estos dos grupos reactivos, el quitosano exhibe maravillosas propiedades químicas y biológicas. El grupo amino primario del quitosano es reactivo y proporciona una plataforma específica para formar uniones con otros grupos laterales bajo condiciones moderadas. Esto hace que quitosano sea un candidato ideal para la bio-fabricación [19].

Este biopolímero también juega un papel importante en la formación de hueso ayudando a la formación de osteoblastos, pero ha ganado más atención en el campo de la ingeniería de tejidos debido a: (1) la posibilidad de producción a gran escala y bajo costo (2) sus grupos funcionales reactivos y cargados positivamente que le permiten formar complejos con polímeros aniónicos, incluidas las proteínas que ayudan a regular la actividad celular, y (3) sus propiedades antibacterianas. Aparte de esto, el quitosano es hemocompatible y no inmunogénico, y es degradable en oligosacáridos no tóxicos dentro del cuerpo debido a la acción de las lisozimas. Se ha reportado que los biomateriales a base de quitosano no producen ninguna reacción inflamatoria o alérgica después de la implantación, inyección, aplicación tópica o ingestión en el cuerpo humano [20]. El quitosano posee propiedades para curar heridas y favorece la regeneración de tejidos tanto blandos como duros. En contraste, muchos polímeros sintéticos exhiben propiedades fisicoquímicas y mecánicas comparables a las de los tejidos biológicos que deben sustituir, pero no son lo suficientemente bioactivos [21]. Por su parte, el quitosano falla en la resistencia a la tensión requerida por diversos tejidos naturales. La falta de resistencia mecánica del quitosano en la ingeniería de tejidos se puede resolver mediante la incorporación de materiales orgánicos y/o inorgánicos de modo que el material híbrido posea propiedades mecánicas y biológicas mejoradas. Recientemente, se han destacado las características de la hidroxapatita como un material de refuerzo prometedor en biocompuestos, las cuales incluyen, excelentes propiedades mecánicas, gran superficie específica, hidrofiliencia, buena biocompatibilidad y bioestabilidad, lo que destaca su potencial en la ingeniería de tejidos.

Capítulo 3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Al utilizar fibras de hidroxiapatita con alta cristalinidad, pureza y orientación preferencial, para la elaboración de un material compuesto HAp-Quitosano, éste material tendrá las propiedades mecánicas y la biocompatibilidad adecuadas para servir como un andamiaje para que las células del cuerpo humano (osteoclastos y osteoblastos) puedan transitar libremente a través del material compuesto y así, llevarán a cabo el proceso de regeneración natural del tejido óseo. El Quitosano es totalmente bio-compatibile y una película de este biopolímero, podrá recubrir y contener a las nanofibras de HAp. De esta forma, el material compuesto servirá de base para la generación de nueva HAp y de colágena sintetizada por las células reconstructoras y ser parte del nuevo tejido óseo.

3.2 Objetivo General:

Sintetizar nanocompuestos quitosano-hidroxiapatita (CS-HAp) con diferentes relaciones de porcentaje en peso de HAp y analizar su estructura y propiedades para su potencial aplicación en la regeneración de tejido óseo.

3.3 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.
- Obtención de películas de quitosano con las capacidades de flexibilidad requeridas para elaborar un material compuesto.
- Elaborar un material compuesto uniendo las nanofibras de HAp con las películas de quitosano. Este material compuesto tendrá aplicaciones

potenciales como material de implante para la regeneración del tejido óseo humano.

- Llevar a cabo la caracterización estructural y las propiedades del material compuesto, por medio de Difracción de rayos X, Microscopía electrónica de barrido (SEM), Calorimetría DSC y TGA, Espectroscopia FTIR, y Pruebas mecánicas.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Capítulo 4. Metodología

4.1 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 4.1 y 4.2). La manera de operar del microondas se explica en el Anexo 6.1.

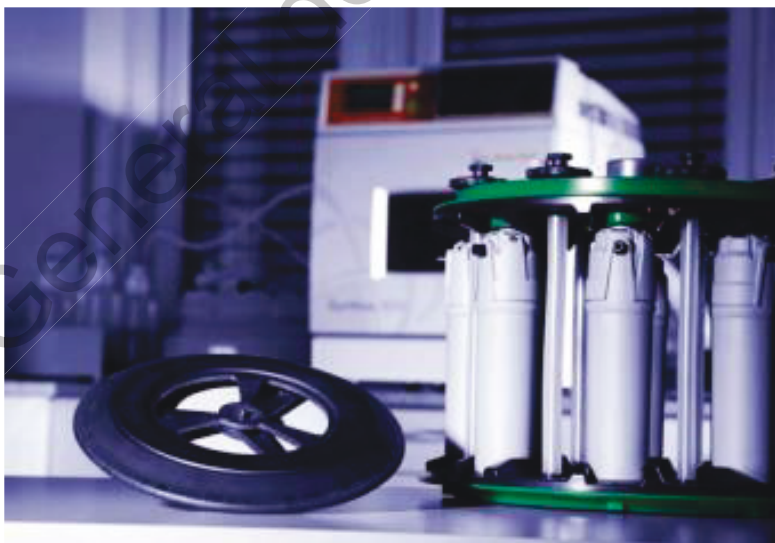


Figura 4.1 Microondas Synthos 3000 con rotor XQ-80



Figura 4.2 Vial de Cuarzo con chaqueta para rotor XQ-80

El procedimiento de síntesis por el método hidrotérmal 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 4.3).



Figura 4.3 Hidroxiapatita sintetizada por el metodo hidrotermal asistido por microondas

4.2 Síntesis de películas CS-HAp

Se partió de un gramo de quitosano en polvo de peso molecular medio (Sigma Aldrich 448877-250G) el cual se puso en agitación magnética con 99 ml de ácido acético 1% v/v a temperatura ambiente durante 16 horas.



Figura 4.4 Agitación de quitosano en polvo con 99% de ácido acético 1 v/v

Se pesó la cantidad adecuada de solución de quitosano en frascos de 20 ml para cada concentración de HAp. Las cantidades adecuadas de hidroxiapatita se pesaron en papel encerado y posteriormente se vertieron en un frasco al cual se le añadieron 4 ml de solución buffer fosfatos como agente dispersante y se colocaron en agitación magnética durante 30 minutos. La HAp se agregó al frasco con quitosano con una micro-pipeta e inmediatamente se colocó para sonicar con una punta de 1/4'' durante tres periodos de 5 minutos de trabajo dejando un minuto entre cada periodo. Cada periodo de 5 minutos con un pulso de 30 segundos de trabajo por 10 segundos en pausa. Después de sonicar, cada mezcla se colocó en una caja Petri y se dejó durante 16 horas en un horno a 60°C.

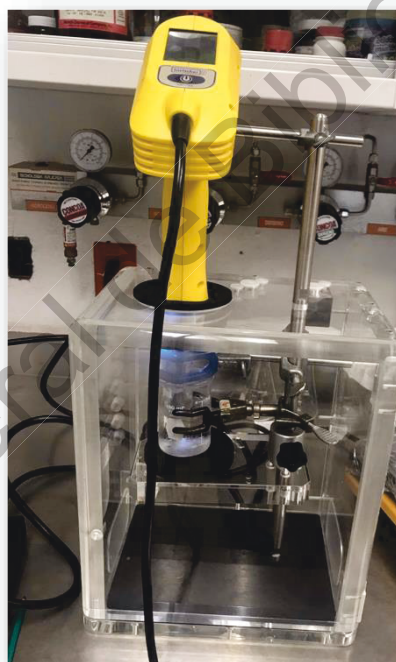


Figura 4.5 Sonicador con punta 1/4 para la solución de quitosano-HAp

4.3 Caracterización de la síntesis de CS- HAp

4.3.1 Difracción de Rayos X por polvos (DRX)

La Difracción de Rayos X por Polvos es una técnica ampliamente utilizada para la identificación de las fases cristalinas de las muestras y para medir sus propiedades estructurales, tamaño y orientación de los cristales. Esta técnica consiste en hacer incidir un haz de Rayos X de longitud de onda de entre .5 a 2 Å, este haz es difractado por los planos cristalinos de la muestra, de acuerdo con la ley de Bragg (Ecuación 4.1).

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (4.1)$$

Donde d es la distancia entre los planos atómicos de la fase cristalina, λ es la longitud de onda de los fotones incidentes y θ es el ángulo de incidencia.

Cuando las ondas de los Rayos X pasan por el interior de los cristales, interfieren unas con otras y dan lugar a nuevas ondas que se desvían de la línea que define el haz incidente, generando una especie de fotografía, característica de cada especie cristalina (como una huella digital), que se denomina patrón de difracción.

Para identificar los componentes cristalinos contenidos en el producto final, todos los análisis de las muestras obtenidas de las reacciones de síntesis y las muestras comerciales [Sigma Aldrich] se obtuvieron con un difractómetro D8 Advance fabricado por Bruker. Las condiciones de operación en el equipo fueron 35 kV de voltaje de aceleración y una corriente de 15 mA con radiación Cu K α (longitud de onda de $\lambda = 1.54$ Å). Todos los experimentos de difracción se realizaron desde 10 ° a 90 ° en una escala de 2θ con un tamaño de paso de 0.05 °.

No se requirió la preparación de la muestra, todas las muestras se colocaron dentro del soporte de la muestra y no se realizó el proceso de molienda. La determinación de no moler la muestra fue para poder determinar la posible orientación

crystallográfica preferencial en las nanoestructuras de HAp. Finalmente, la fase cristalina se comparó con el banco de archivos de difracción de polvo (PDF) proporcionado por el Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD).

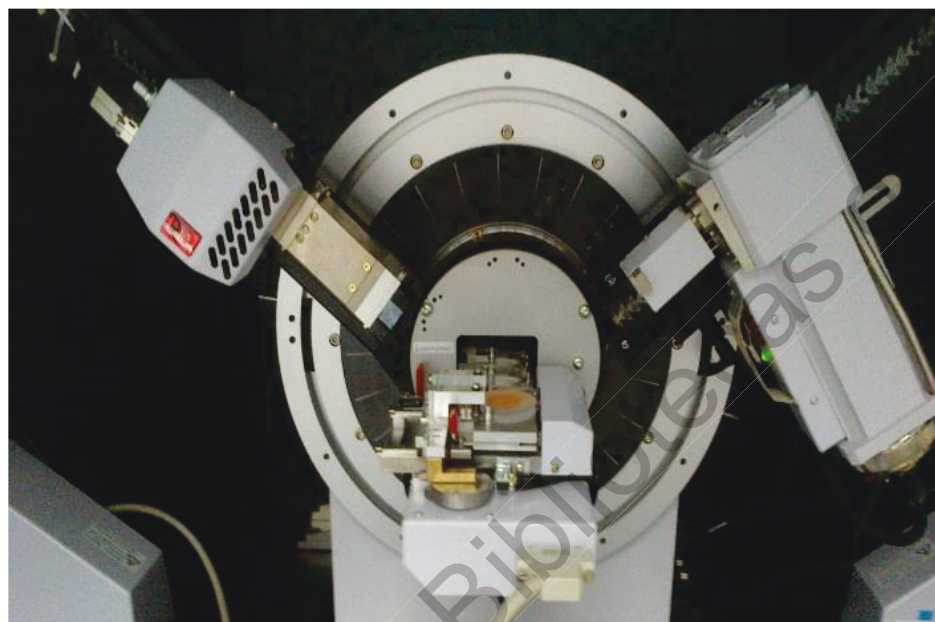


Figura 4.6 Difractómetro de Rayos X por polvos

4.3.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR)

En la espectroscopia infrarroja se hace interactuar una onda electromagnética, con una longitud de onda en el intervalo del infrarrojo, con la materia. Las moléculas a analizar absorben la energía aportada por las ondas provocando una variación en la vibración de los enlaces, entre los átomos que la forman. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se provoque una transición vibracional en alguno de los enlaces de la molécula. Este enlace absorberá la radiación y se traducirá en un aumento en su frecuencia de vibración, y por ende, un aumento en la distancia de enlace, haciendo que ambos átomos se alejen más de lo normal, es decir, los átomos vibren a una distancia promedio mayor a la distancia del enlace, lo que se traduce en que

el enlace ha pasado entonces a otro estado energético que está cuantizado, conocido como estado excitado.

Como resultado de un análisis de infrarrojo se obtiene un espectro, el cual es una gráfica de números de onda contra intensidad donde las bandas que aparecen están asociadas a los grupos funcionales o enlaces presentes en las moléculas que se analizan. Apoyándose de tablas espectrales existentes, es posible establecer los tipos de enlaces presentes en una muestra. La amplitud de las bandas está determinada por las interacciones químicas del segmento de la molécula o grupo funcional que presenta vibraciones en determinada longitud de onda, cuando hay varias interacciones químicas el pico resultante es amplio. Si hay pocas interacciones químicas, el pico será agudo y la intensidad estará directamente relacionada con la concentración, a mayor concentración más intenso es el pico.

Para este análisis se utilizó un espectrofotómetro Brucker, Vectro 33 a 16 barridos. El análisis se realizó colocando las muestras previamente molidas directamente en el detector, presionando el polvo mediante un tornillo especial; la limpieza entre análisis se realizó con alcohol etílico.

4.3.3 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

En un microscopio electrónico de barrido (SEM), un haz es emitido por un cañón de electrones, ya sea por acción termo-iónica o por el efecto de un campo eléctrico intenso. Este haz de electrones es colectado y enfocado por medio de lentes electromagnéticas condensadoras. Una bobina de escaneo hace oscilar al haz produciendo un barrido sobre la superficie de la muestra a analizar. La interacción entre el haz de electrones y la muestra, generan varios tipos de señales como electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos X característicos, electrones Auger y fotones de diferentes energías. Los electrones secundarios y los retrodispersados pueden ser utilizados para formar una imagen de la muestra.

El barrido electrónico sobre la muestra se sincroniza con el barrido electrónico en un tubo de rayos catódicos (Monitor de TV) lo que facilita la formación de la superficie de la muestra punto por punto y línea por línea.

El SEM construye indirectamente un patrón o mapa que puede interpretarse como una imagen del objeto. La interpretación de la "imagen" SEM es promovida por muchos otros atributos que contribuyen a la visibilidad, particularmente la resolución, el contraste, la profundidad de foco, la morfología, la iluminación aparente y el aspecto tridimensional (Rochow, 1978).

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. En el presente trabajo, las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6390L empleando 20 kV de voltaje de aceleración y utilizando electrones secundarios para la formación de las imágenes.

4.3.4 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 ruptura, para determinar sus propiedades de dureza, elasticidad, fragilidad y plasticidad.

El esfuerzo de compresión es la resultante de las 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 de sus dimensiones 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 para presionar a la probeta, la cual reduce su dimensión a lo largo de la dirección de aplicación 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:

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \quad (4.2)$$

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 transversal original de la probeta antes de aplicar la carga, por lo tanto, las unidades del esfuerzo a la compresión son lb/in^2 o N/m^2 (Pascales).

La deformación se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\varepsilon = \frac{L_i - L_0}{L_0} = \frac{\Delta L}{L_0} \quad (4.3)$$

Donde L_0 es la longitud original de la probeta antes de aplicar la carga, L_i es la longitud instantánea, y $L_i - L_0 = \Delta L$ es el cambio de la longitud de la probeta en un instante determinado con respecto a la longitud inicial.

Para las pruebas de tensión en física e ingeniería, se denomina tensión mecánica a la fuerza por unidad de área en el entorno de un punto material sobre una superficie real o imaginaria de un medio continuo. La definición anterior se aplica tanto a fuerzas localizadas como fuerzas distribuidas, uniformemente o no, que actúan sobre una superficie.

En este ensayo, como se describe en la norma ASTM D638, es posible la determinación de algunos parámetros como el punto de cedencia y la resistencia a la tensión. En esta prueba la muestra se somete a una carga uniaxial de tensión continuamente creciente hasta que el material llega a la falla. Durante todo el ensayo se registran tanto la carga como el alargamiento producido en determinados puntos de carga.

En este trabajo, se llevaron a cabo ensayos mecánicos de tensión utilizando para ello una máquina universal de pruebas mecánicas Zwick/Roell Z005 con una celda de carga de 5 KN y una velocidad de deformación de 1mm/min. Las piezas (5 por cada tipo de muestra) se sometieron a un proceso de corte por medio de un cortador que ya tiene la forma y las medidas adecuadas según la norma ASTM D638 para películas poliméricas delgadas

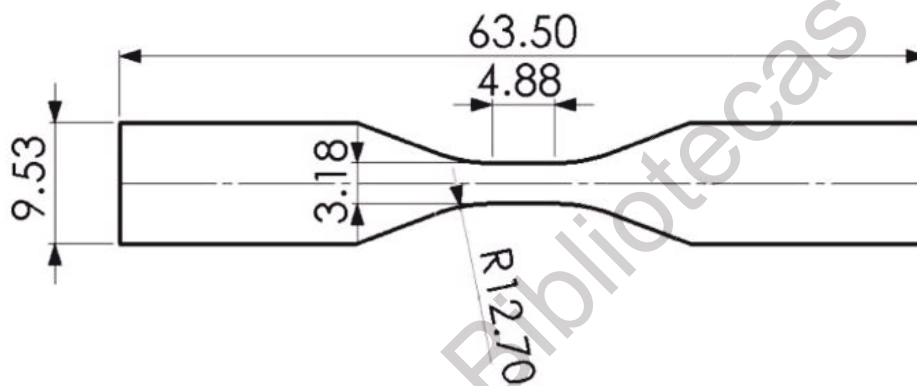


Figura 4.7 Medidas del cortador de la norma ASTM D638 para películas delgadas



Figura 4.8 Cortador para películas poliméricas delgadas

Capítulo 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Difracción de Rayos X

Los resultados de los análisis por difracción de rayos X de todas las muestras de HAp sintetizadas en este trabajo fueron similares. Cada difractograma obtenido fue comparado con el banco de archivos de difracción por polvos “Powder Diffraction File” (de sus siglas en inglés PDF) proporcionado por el Centro Internacional de Datos de Difracción “International Centre for Diffraction Data” (ICDD). En todas las muestras analizadas se encontró una sola fase cristalina, la cual fue la misma en todas ellas, correspondiente a la HAp según el ICDD-PDF # 09-0432, esto es indicativo de que la HAp sintetizada es de alta pureza.

El difractograma que aparece en la Figura 5.1.1 corresponde a la HAp sintetizada por el método hidrotermal asistido por microondas, todas las reflexiones de Bragg registradas en el mencionado PDF aparecen en el difractograma, y están indexadas las principales de ellas de acuerdo a su intensidad, las cuales corresponden a los planos (300), (211), (100), (130), (120), (140) y (200). Cabe hacer notar que las reflexiones de Bragg en el difractograma están bien definidas y son muy estrechas, y el difractograma tiene un bajo nivel de ruido, lo cual indica la presencia de HAp con un tamaño grande de cristalito y altamente cristalina (Tripathi, G. y Basu, B. 2011).

El PDF # 09-0432 indica que la reflexión de Bragg más intensa corresponde al (211), pero como se puede observar en el difractograma de la figura 5.1.1, la reflexión más intensa es la registrada para los planos (300), siendo la intensidad para el plano (211) es apenas de un tercio respecto a la del (300). El uso de ácido glutámico en la mezcla de síntesis y el control de la temperatura y la presión dentro del reactor durante la reacción, dieron como resultado una orientación cristalina preferencial en la dirección [300]. Además, utilizando el programa “EVA” provisto por Bruker, se determinó el tamaño promedio de cristalito en la HAp por medio de la ecuación de Scherrer, y se encontró un valor de 64.15 nm.

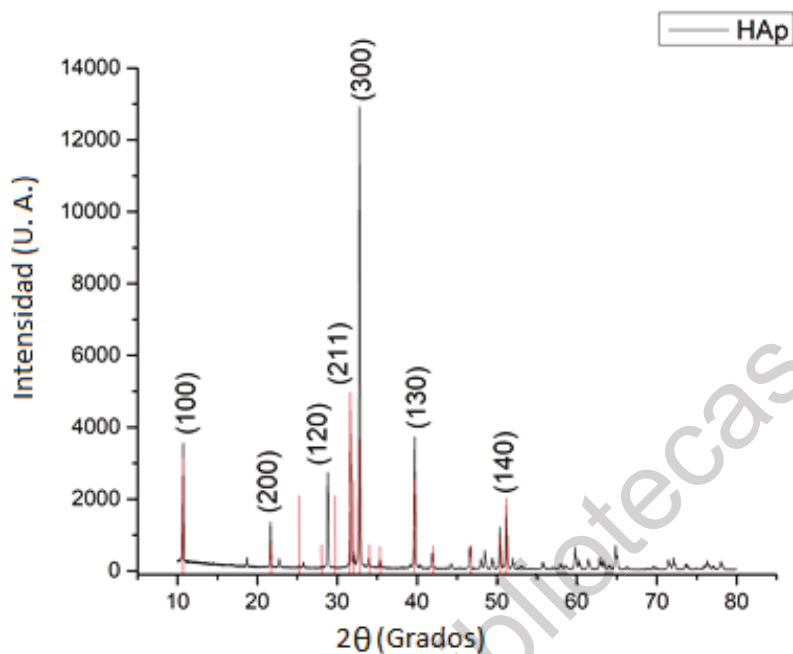


Figura 5.1 Difractograma de la HAp sintética identificado con el PDF # 09-432

Además, hubo otras reflexiones de Bragg que mostraron también un incremento en sus intensidades respecto a lo reportado en el PDF, las reflexiones correspondientes a los planos (100) y (200) mostraron dicho incremento, estas reflexiones suelen presentar intensidades de alrededor del 19,6% y 8,2% respectivamente, pero en el difractograma se ve que tienen intensidades de un 30% y un 15% respectivamente con respecto a la reflexión del (300).

En contraste, otras reflexiones de Bragg redujeron sus intensidades, la más considerable fue la correspondiente al (002) encontrada aproximadamente a 25 grados en 2θ , que típicamente posee una intensidad muy elevada aproximadamente de un 45% respecto a la intensidad más alta según el PDF # 09-432, pero en el difractograma de la figura 5.1.1, esta reflexión es demasiado pequeña, y en relación con la intensidad registrada por la reflexión correspondiente al (300), es casi parte del ruido de fondo. La variación en la intensidad de las señales mencionadas es una

indicación de una notable orientación cristalina preferencial a lo largo del eje "a" de la estructura cristalina hexagonal de la HAp.

Con el fin de poner en perspectiva la alta cristalinidad de la HAp sintetizada en este trabajo, la Figura 5.1.2 muestra los difractogramas de difracción de rayos X por polvos de la HAp comercial (Sigma Aldrich) (abajo) y la HAp sintetizada por el método hidrotérmal asistido por microondas (arriba). Como se hizo anteriormente, en los difractogramas de la Figura 5.1.2 se indica la indexación de las principales reflexiones de Bragg correspondientes a la HAp. Es importante mencionar que el ancho de las reflexiones encontradas en el difractograma de la HAp comercial es mayor que el registrado para aquellas correspondientes a la HAp obtenida en este trabajo; además, las reflexiones para esta última son más y mejor definidas. Lo anterior nos indica una alta cristalinidad en esta HAp y de mayor tamaño promedio de cristalito.

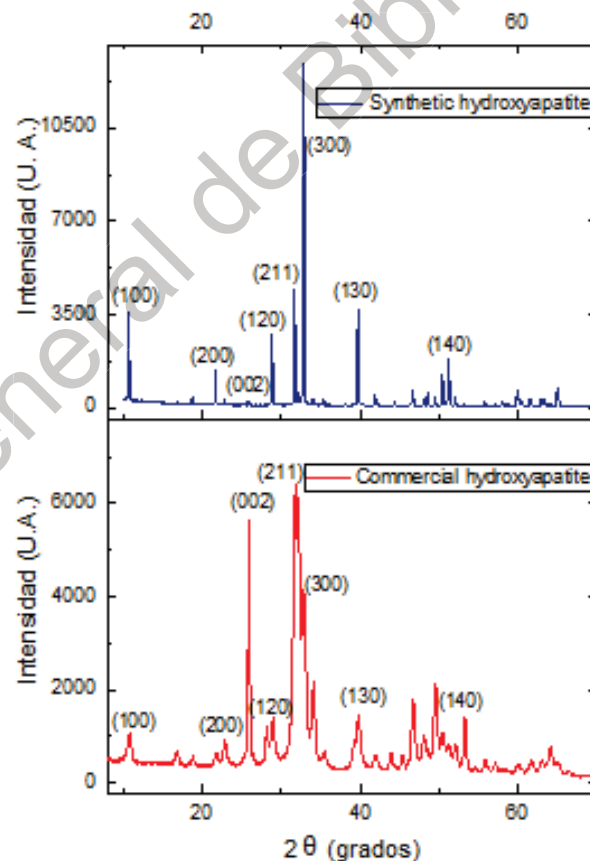


Figura 5.2 Difractograma de HAp comercial [Sigma Aldrich] y sintetizada por el método hidrotérmal asistido por microondas y usando Acido Glutámico como orientador.

Además, en la Figura 5.1.3 se presenta un difractograma de HAp comercial de origen humano. La cristalinidad de la HAp sintetizada por nuestro grupo de trabajo es mayor que la HAp comercial (Sigma Aldrich) pero comparada con la HAp comercial de origen humano, las diferencias son más notorias ya que este difractograma presentan mucho ruido y las reflexiones de Bragg son amplias e indica muy poca cristalinidad.

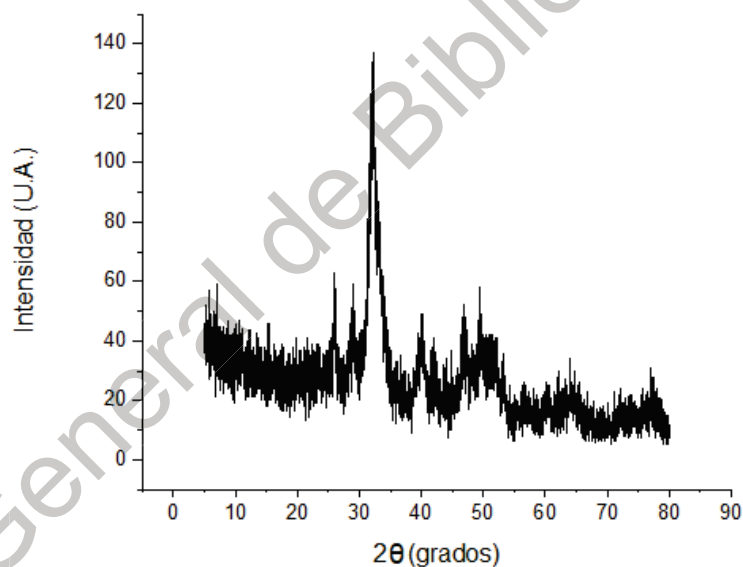


Figura 5.3 Difractograma de HAp comercial de origen humano.

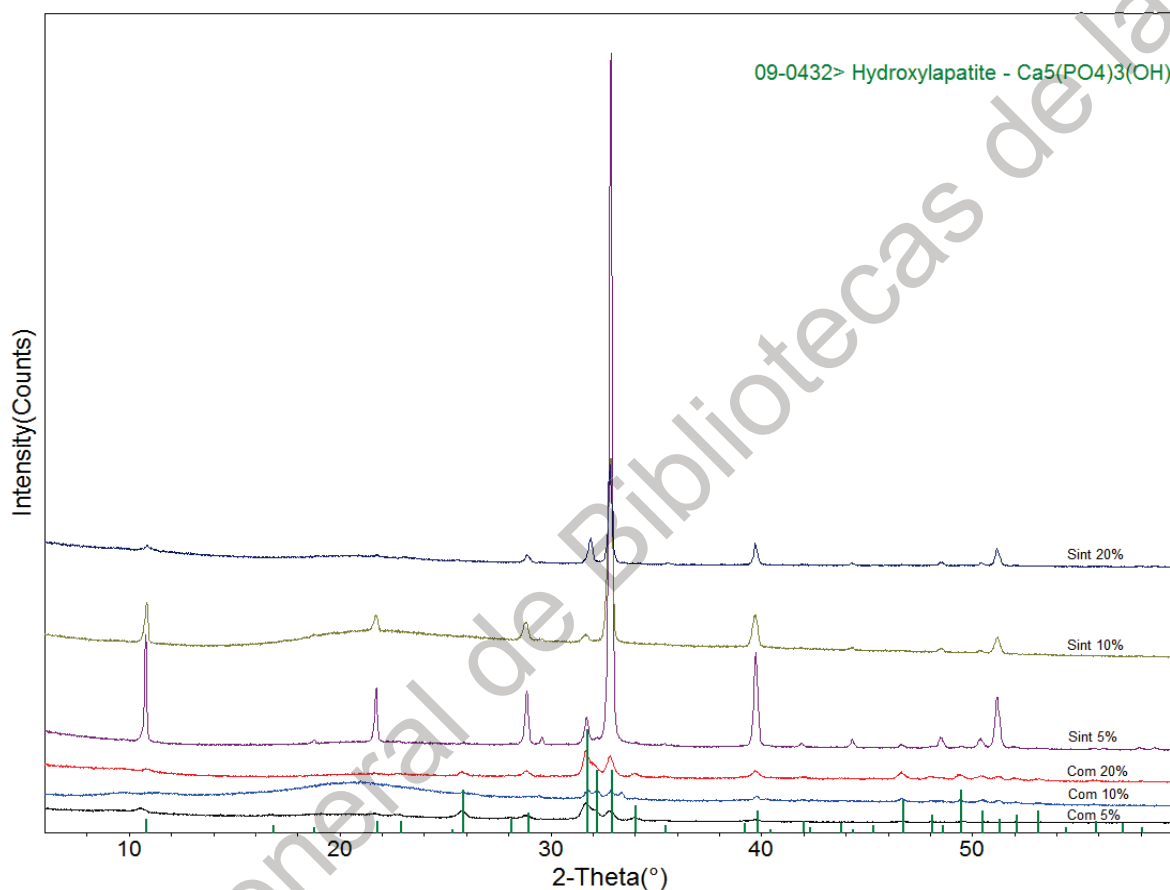
La morfología de las fibras observadas en el SEM (reportadas en capítulos posteriores) que cuentan con una sección transversal hexagonal permite explicar los resultados de DRX de una mejor manera. En el método de preparación de las muestras para esta técnica analítica, las fibras descansan en el porta-muestras del XRD y la mayoría de ellas adquieren una disposición de tal manera que sus

secciones transversales hexagonales son perpendiculares a la superficie del porta-muestras, mientras que la longitud de las fibras son paralelas a dicha superficie. Como consecuencia, la mayoría de los vectores a^* o b^* (que son equivalentes) del espacio recíproco de la estructura cristalina de HAp son ortogonales a la superficie del porta-muestras, y por ello, aumenta la probabilidad de interactuar con la onda incidente y con ello, se satisfagan las condiciones de difracción. En contraste, un gran número de los vectores c^* del espacio recíproco se encuentran paralelos a la superficie de la muestra y la probabilidad de satisfacer la condición de Bragg disminuye considerablemente.

Por lo tanto, esta distribución de las fibras hace posible que las reflexiones de Bragg producidas por aquellos planos ortogonales al eje "a" de la estructura cristalina de la HAp tengan una gran intensidad; por el contrario, la reflexión generada por los planos perpendiculares al eje "c" de dicha estructura, disminuye significativamente su intensidad. Por esa razón, en las visualizaciones de difractogramas en la Figura 5.1 y la parte superior de la Figura 5.2, las contribuciones de los planos (300), (200)

y (100) poseen intensidades altas, mientras que la intensidad correspondiente al (002) es casi nula.

Figura 5.4 Difractogramas obtenidos de las diferentes mezclas de Cs- HAp, conteniendo HAp comercial o sintética, con concentraciones de 5%, 10% y 20% en peso. Nótese la diferencia en la cristalinidad de la HAp.



En la figura 5.4, se muestran los difractogramas de las diferentes películas de quitosano con hidroxiapatita, tanto comercial como sintética. Es evidente la alta calidad cristalina de la HAp sintetizada en este trabajo con respecto a su similar comercial; además, es notable la orientación cristalina preferencial que tiene la HAp obtenida por el método hidrotérmal asistido por microondas en la dirección [110]. Estas características cristalinas pueden ser un aporte relevante para las propiedades mecánicas del material compuesto Quitosano-HAp.

5.2 Espectroscopia Infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR)

A través de esta técnica espectroscópica se analizaron muestras de HAp y el quitosano puros por separado, y también, las películas de las mezclas Cs-HAp. Se buscaron modificaciones en las bandas de los respectivos espectros, ya sea en su intensidad, posición o ancho que dieran evidencia de que algunos grupos funcionales tanto en el quitosano como en la HAp, estuvieran participando en una interacción química entre ambos materiales.

En la figura 5.6 se observan los espectros de FTIR de los componentes puros y de las mezclas de Cs-HAp formadas tanto por la HAp comercial como por las nanofibras de HAp. En el caso del espectro del quitosano destacan las bandas a 3500 cm^{-1} correspondientes a los grupos (-OH), la señal a 3400 cm^{-1} correspondiente a la vibración del enlace N-H de una amina primaria, a 3280 cm^{-1} generada por la vibración de los enlaces N-H en el grupo (NH_3^+) y las señales a 1640 y 1545 cm^{-1} generados también por la vibración del enlace N-H de amina.

Para el caso de la HAp, se destacan las bandas a 3500 cm^{-1} correspondientes a los grupos (-OH) y las señales a 1100 y 1020 cm^{-1} generados por la deformación de los grupos fosfato (PO_4).

En los espectros de las mezclas, se ve como se combinaron las bandas intensas y anchas alrededor de los 1100 cm^{-1} de la HAp y el quitosano para formar una banda ancha, la cual no mostró grandes cambios en función de la concentración de HAp en la película de quitosano. Los principales cambios se observaron en las bandas a 1640 y 1545 cm^{-1} , las cuales experimentaron una variación en su intensidad, lo cual puede ser indicativo de que los grupos amino están teniendo una interacción química. Este es más evidente en la banda a 1545 cm^{-1} en donde se aprecia como el grupo NH_3^+ cambia su modo de vibrar, posiblemente porque se libera de un grupo H^+ para poder interactuar químicamente.

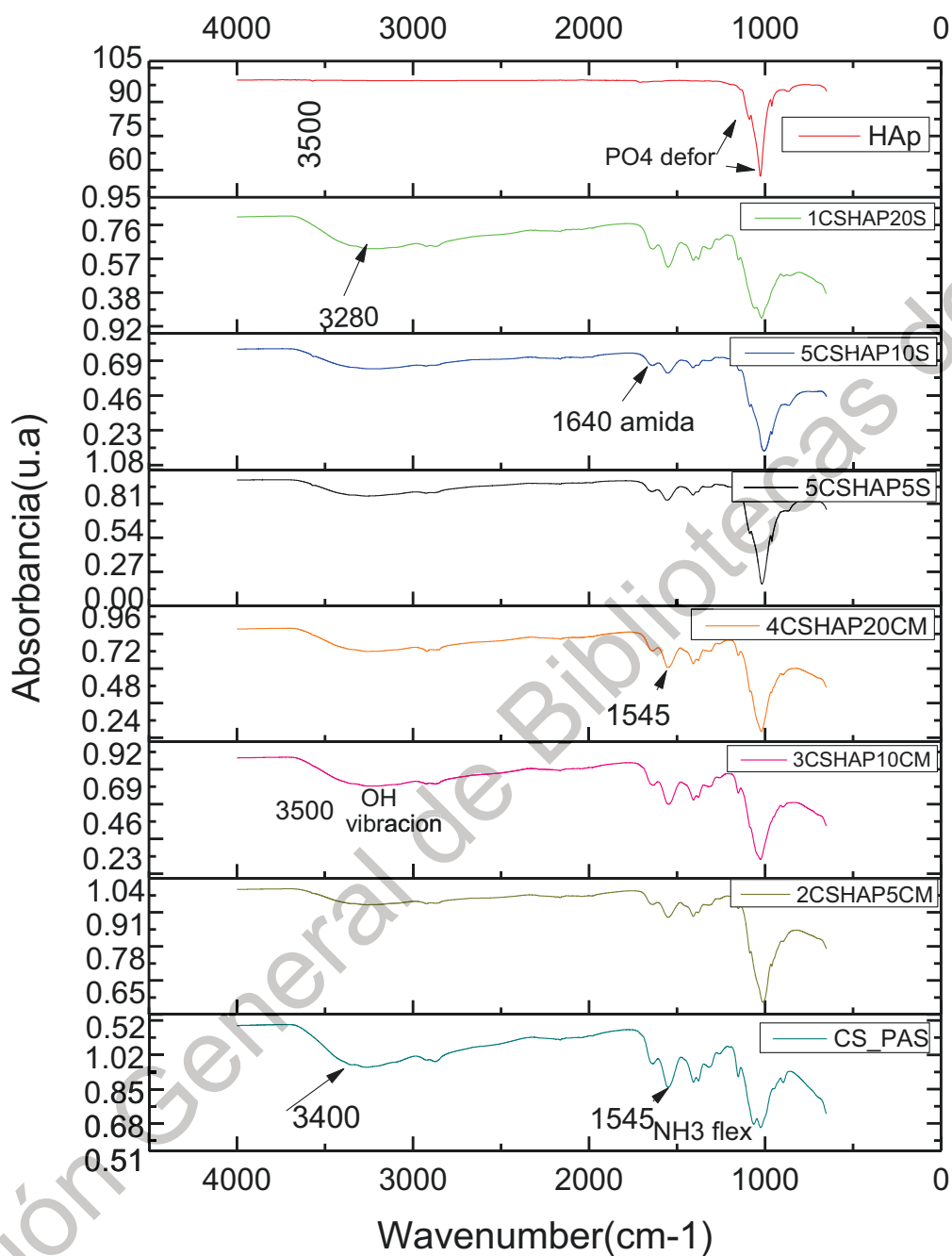


Figura 5.6 Espectro Infrarrojo de películas CS-HAp (Intervalo 4000-0 cm^{-1}).

En la figura 5.7 se observa una zona amplificada de los espectros de infrarrojo obtenidos para las diferentes películas en el intervalo de 1750 a 1200 cm^{-1} , en los cuales se detallan los cambios observados. Se tienen las variaciones para las

bandas a 1640 cm^{-1} y 1545 cm^{-1} . Existe un ligero cambio de posición en las señales mencionadas, pero se destaca un cambio en su intensidad. Aunque estos cambios no son consistentes con el aumento en concentración de HAp en la película de quitosano, son evidentes estos cambios, indicándonos que el grupo amina (o el grupo NH_3^+) está interactuando químicamente para formar una unión secundaria.

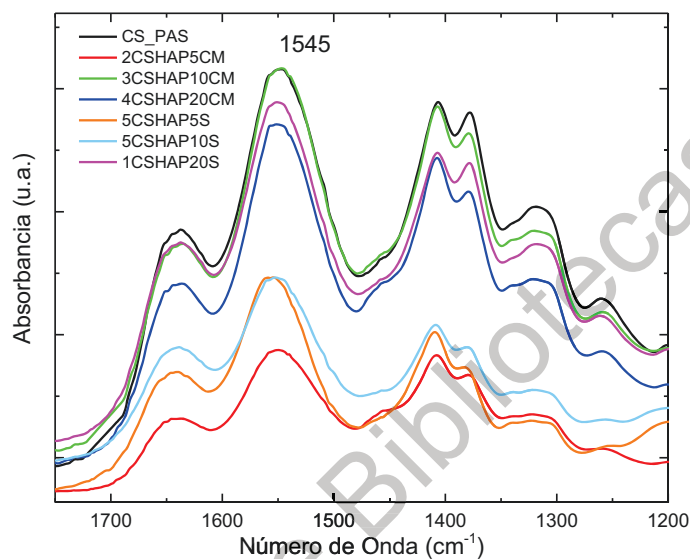


Figura 5.7 Espectros de Infrarrojo de películas CS-HAp (Intervalo $1750\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$).

En la figura 5.8 se muestra una zona ampliada de los espectros obtenidos en el intervalo de 1200 a 900 cm^{-1} donde se aprecia cómo se fueron combinando las respuestas ante el infrarrojo de las bandas correspondientes a los grupos fosfatos de la HAp a 1100 y 1020 cm^{-1} , y aquellas a 1063 y 1048 cm^{-1} correspondientes a la vibración del enlace C-O del anillo de glucosa y la banda a 1170 cm^{-1} generada por el enlace C-O de los carbonos que sostienen a los grupos -OH. Es evidente que estos cambios de posición e intensidad en las bandas se deben a la superposición de las mismas y no al producto de la interacción de los mencionados grupos funcionales para producir un enlace secundario.

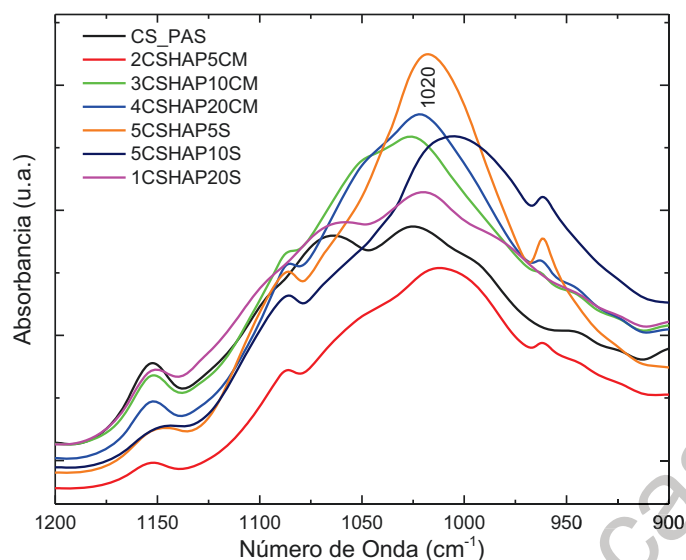


Figura 5.8 Espectro Infrarrojo de películas CS-HAp (Intervalo 1200-900 cm⁻¹).

5.3 Raman

Las películas de la mezcla Cs-HAp fueron analizadas a través de espectroscopia Raman, y similar a los estudios llevados a cabo con FTIR, se hicieron buscando diferencias en posición, intensidad o ancho de las señales, que nos dieran evidencia de la interacción química entre ambos componentes.

En la figura 5.9 se muestran los espectros de las películas de quitosano conteniendo diferentes concentraciones de HAp, tanto comercial como nanofibras de HAp. En ellos es posible ver las bandas a 1076 y 1046 cm⁻¹ correspondientes al estiramiento asimétrico de los grupos fosfato (PO₄) de la HAp. También, se observan señales a 610, 594 y 582 cm⁻¹ generados por la flexión triplemente degenerada de estos grupos y bandas a 447 y 433 cm⁻¹ también generados por los modos de flexión doblemente degenerados de los grupos fosfato. Otra señal muy visible en los espectros, está a 965 cm⁻¹ y corresponde al estiramiento simétrico de los grupos fosfatos de la HAp. Esta señal se superpone con aquella producida por la vibración del grupo (NH₃⁺) del quitosano.

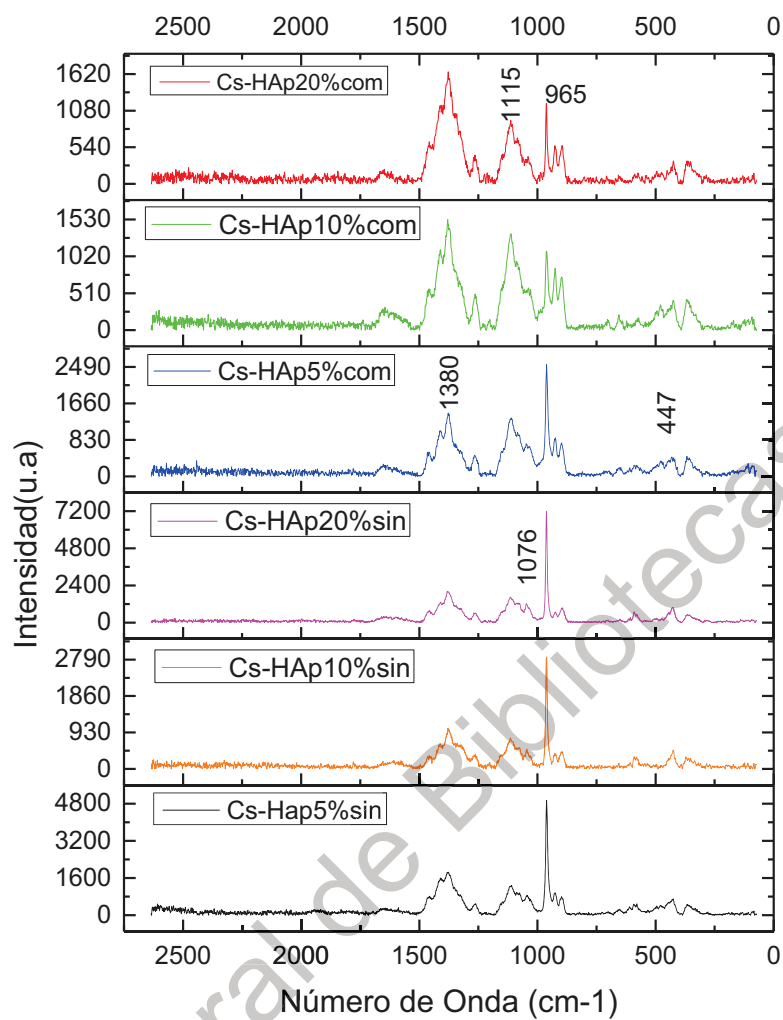


Figura 5.9 Espectros Raman de las películas CS-HAp comercial con diferentes concentraciones de HAp.

Esta señal a 965 cm⁻¹ varía de intensidad y un poco su ancho, con los diferentes contenidos de HAp en la película de quitosano.

En la figura 5.10 se muestra una zona ampliada de 400 a 1600 cm^{-1} de los espectros Raman de las películas de quitosano con diferentes concentraciones de HAp comercial. Se puede observar que casi no hubo cambios en la posición e intensidad de las bandas excepto para la señal a 965 cm^{-1} . Esta señal sufrió un descenso en su intensidad al aumentar la concentración de HAp en la película de 5 a 10% en peso, pero al elevar la concentración de HAp hasta un 20%, se ve un ligero aumento en la intensidad de la banda. Asimismo, en los espectros se observa que el ancho de esta banda cambia ligeramente, disminuyendo su ancho con el incremento de HAp.

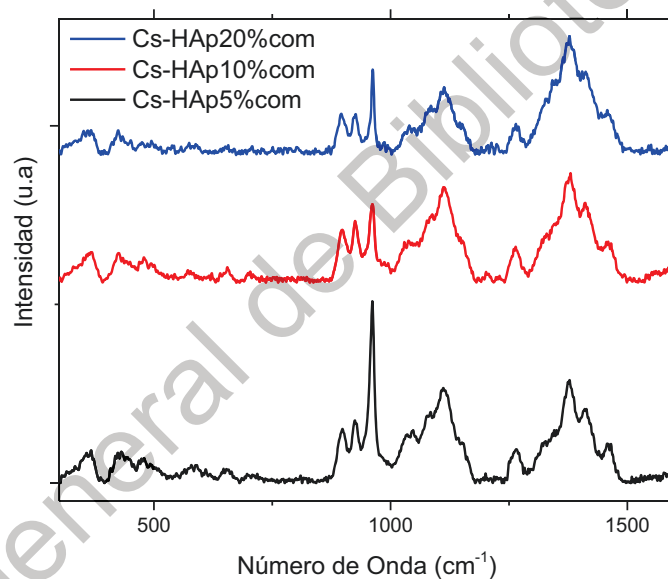


Figura 5.10 Espectros Raman de las películas CS-HAp comercial con diferentes concentraciones de HAp.

En la figura 5.11 se muestran los espectros Raman obtenidos de las películas CS-HAp con nanofibras de HAp, donde en comparación con los espectros de las películas con HAp comercial, se muestra que la banda a 965 cm^{-1} experimenta nuevamente un descenso en su intensidad al pasar de una concentración de 5% a

10% en peso, pero posteriormente, al aumentar la concentración de HAp hasta un 20%, se observó un aumento notable en su intensidad. Nuevamente, en estos materiales, se observa una ligera disminución del ancho de la banda con el incremento en la concentración de HAp, aunque no tan evidente como lo observado en las mezclas con HAp comercial.

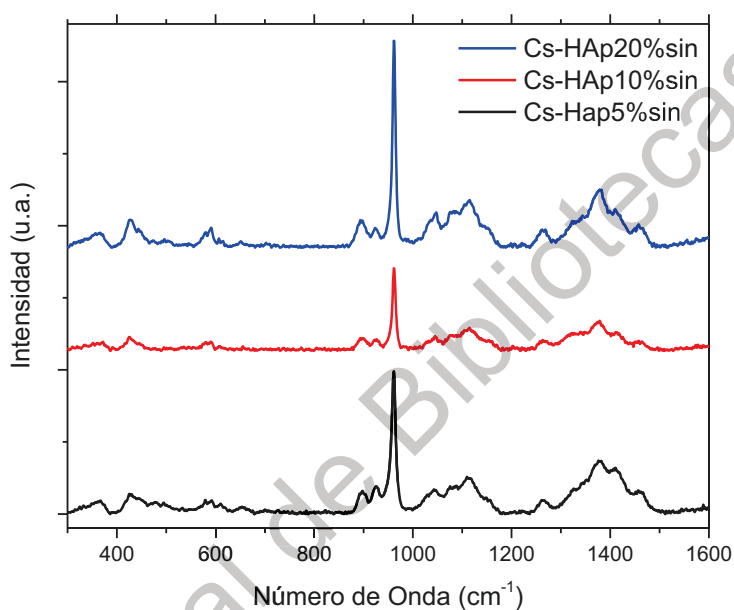


Figura 5.11 Espectros de Raman de las películas CS-HAp con HAp de nanofibra a diferentes concentraciones.

Como se mencionó anteriormente, la banda a 965 cm^{-1} es la superposición de las vibraciones de los grupos fosfato y los grupos NH_3^+ , es posible que los cambios en intensidad y ancho de esta banda se deban en parte a la diferente concentración de los componentes en la mezcla, pero es posible que en parte, las variaciones de dicha señal se deban a la interacción que están teniendo los grupos amino protonados, los cuales podrían estar formando uniones secundarias con otros grupos funcionales en la HAp.

Los resultados de espectroscopia Raman corroboran los hallazgos de FTIR, indicándonos que los grupos amino del quitosano están teniendo una interacción química, con la cual posiblemente estén formando un enlace secundario como un puente de hidrógeno. No se encontró evidencia de un enlace Ca-N con el que se comprobaría que dicha unión secundaria se estaría formando entre los mencionados grupos amino y los iones de calcio tipo I de la HAp, pero se continuará con el estudio de la estructura molecular de los materiales compuestos con el propósito de comprobar la presencia de dicho enlace.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

5.4 Microscopia Electrónica de Barrido

Con la ayuda del microscopio electrónico de barrido se observó la morfología y las características topológicas de la HAp, tanto comercial como sintética. En la figura 5.12 se presenta una micrografía de la HAp comercial, la cual presenta una morfología de partículas alargadas similares en forma a los bacilos con un tamaño promedio de ancho de 4 μm . Estas partículas no tienen facetas bien definidas, lo que indica un deficiente crecimiento cristalino, pero su superficie aparenta ser muy lisa y regular.

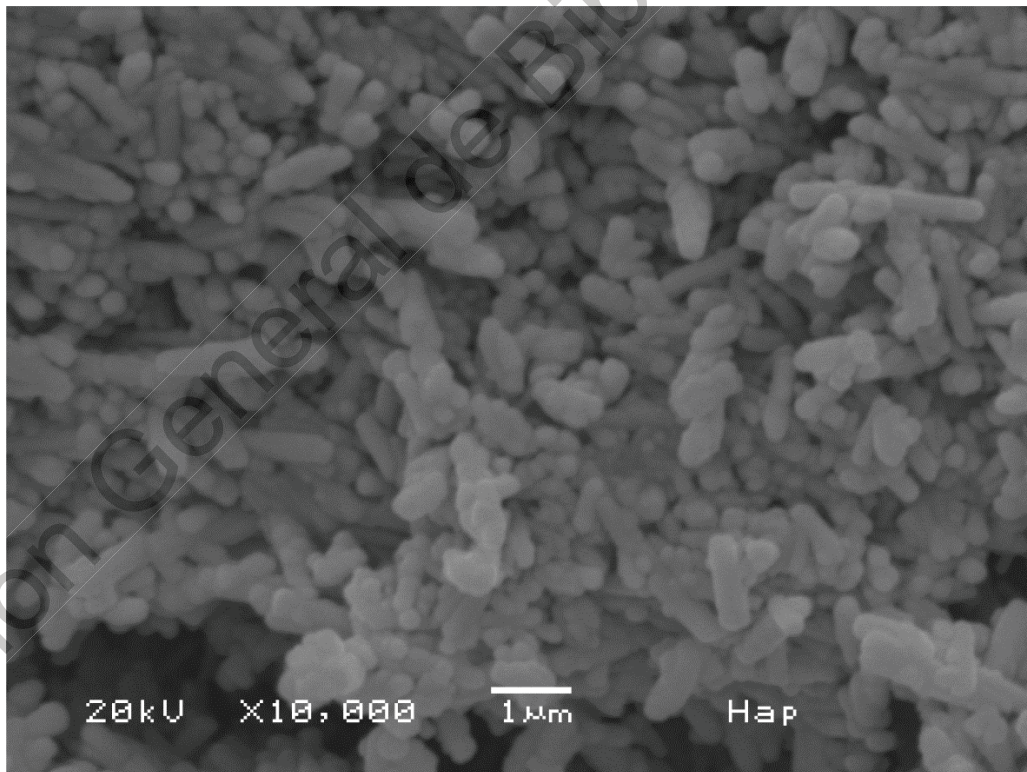


Figura 5.12 Micrografía de SEM de las partículas de HAp comercial.

Por su parte, en la muestra de HAp sintetizada en este trabajo se encontró una morfología de microfibras con un perfil hexagonal, como se ve en la micrografía de la Figura 5.13. Las fibras presentan facetas y bordes bien definidos, y esto es evidencia de un buen crecimiento cristalino. La sección transversal hexagonal tiene un diámetro promedio de $4.52\ \mu\text{m}$ y con longitudes de unas pocas decenas de μm . Es importante tener en cuenta que además de mostrar una buena calidad cristalina, las fibras aparentan ser muy sólidas, lo que es deseable en esta investigación, ya que esta característica estructural puede aportar a su resistencia mecánica, y a su vez, a la resistencia mecánica del compuesto Cs-HAp.

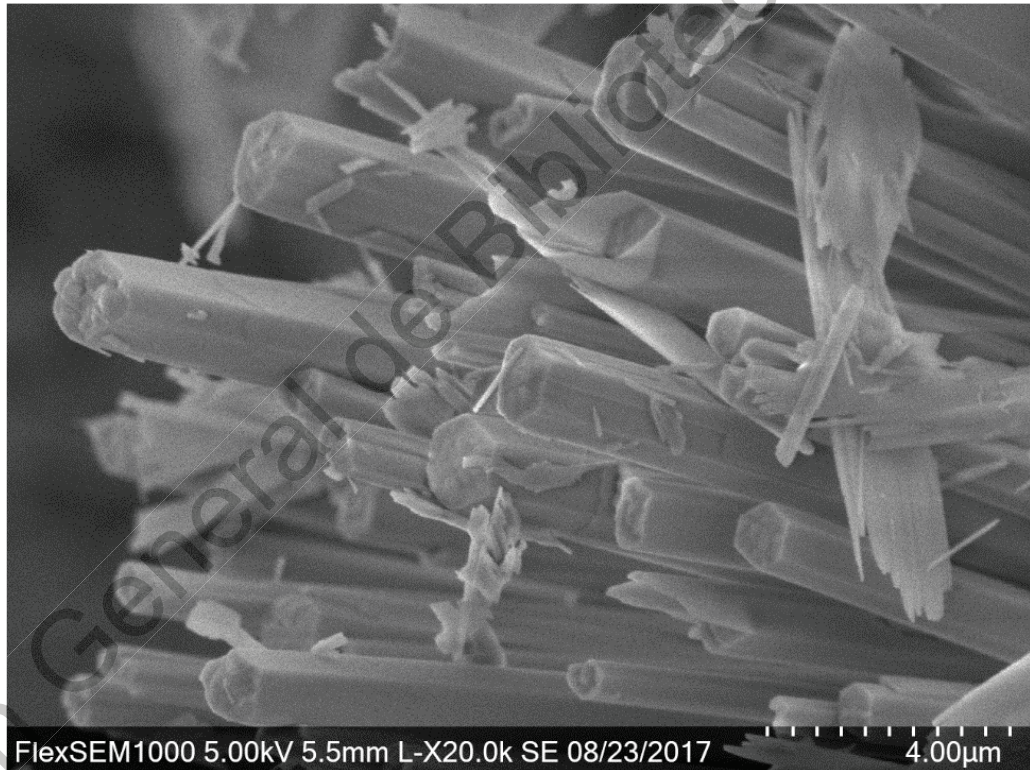


Figura 4.13 Micrografía de SEM en la que se muestran las nano fibras obtenidas por el método hidrotérmico asistido por microondas

Con el fin de analizar a mayor detalle la morfología de la HAp sintética, se hicieron observaciones de las fibras a mayores ampliaciones. En la figura 5.14 se puede

ver que la microfibrilla está formada a su vez, por segmentos más pequeños, de hecho en trabajos previos del grupo de trabajo, se encontró que las microfibrillas están formadas por la unión de nanofibrillas [artículo de Rafa]. Además, en la micrografía se ve con mayor claridad el perfil hexagonal de las fibras, con facetas y bordes bien definidos. Así mismo, es posible ver en la figura que el extremo de la fibra se fracturó y segmentó por acción mecánica, dejando libres algunos fragmentos sobre su superficie.

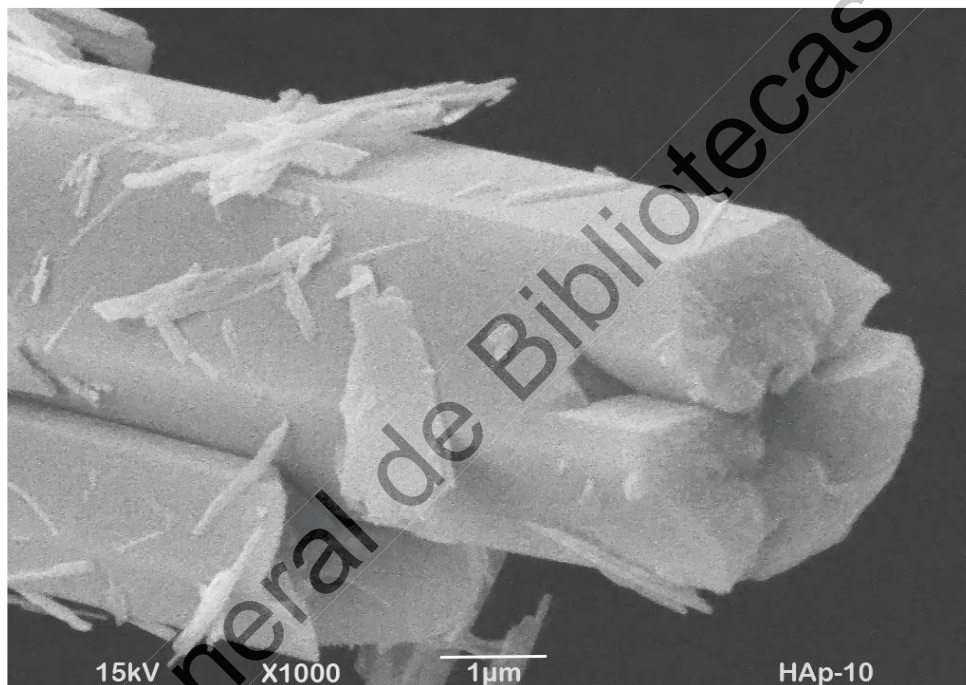


Figura 5.14 Micrografía a mayor amplificación de una fibra de HAp mostrando su perfil hexagonal.

Posteriormente, se llevaron a cabo observaciones al SEM de las muestras de las películas de la mezcla Cs-HAp. En la figura 5.15 se presenta una micrografía de la película formada con quitosano y HAp comercial, y se aprecia que la dispersión de la HAp dentro de la película fue bastante buena, obteniéndose un material homogéneo; también, se ve que el quitosano de la película recubrió muy bien a las partículas de HAp y se aprecia que hay muy buena adherencia entre ambas fases,

lo cual es benéfico para las propiedades mecánicas del material compuesto. Con estos resultados es evidente que el uso del sonicador fue relevante para lograr la buena dispersión de las partículas de HAp en la película.

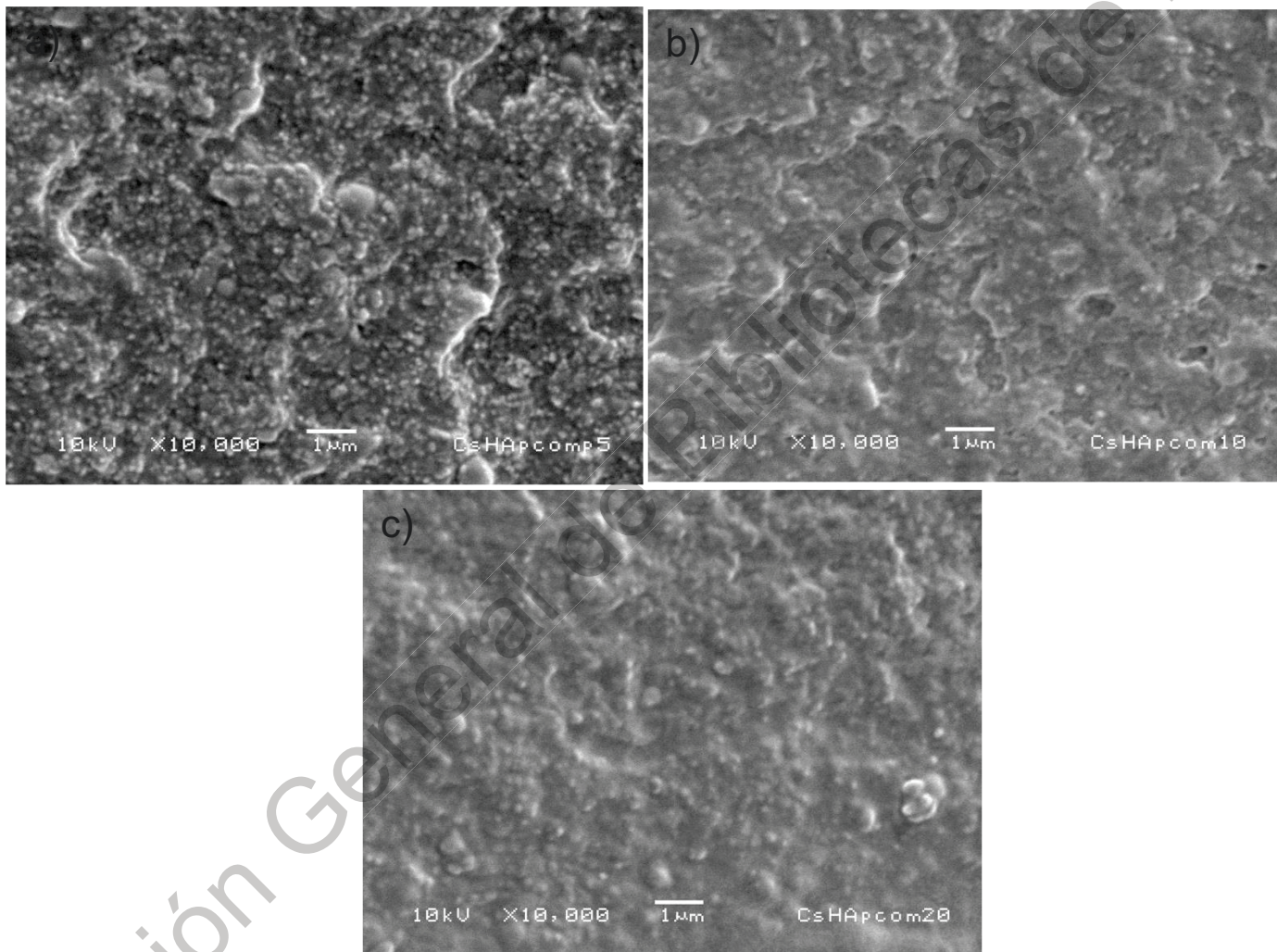


Figura 5.15 Micrografías de SEM de las películas de quitosano con HAp comercial con concentraciones de a) 5, b) 10 y c) 20% en peso.

Para el caso de las películas de quitosano con la HAp de nanofibras, se encontró para la mayoría de las muestras que un gran número de las nanofibras se conservaron intactas, sin que se hubiesen fracturado o agrietado producto del proceso de elaboración del material compuesto, como se puede ver en las micrografías de la figura 5.16. Este resultado es relevante ya que, al conservarse la mayor parte de las nanofibras, se incrementa la posibilidad de que su resistencia contribuya a las propiedades mecánicas del material Cs-HAp.

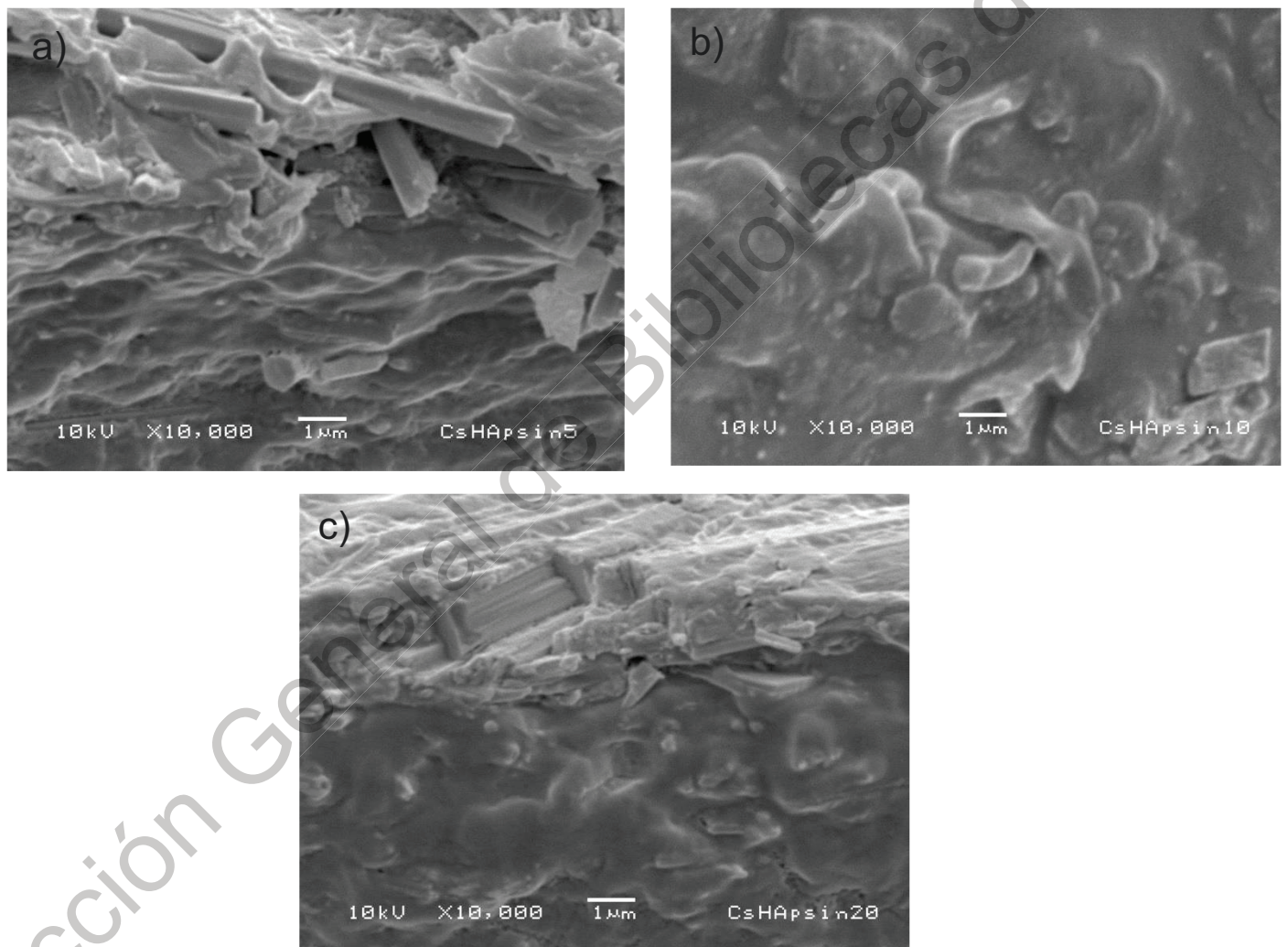


Figura 5.16 Micrografías de SEM de las películas de quitosano con HAp sintética concentraciones de a) 5%, b) 10% y c) 20% en peso.

En las micrografías de la figura 5.16, se puede ver una buena dispersión de las fibras de HAp dentro de las películas de quitosano y también se aprecia una buena adherencia entre ambas fases, posiblemente producto de la interacción química entre los grupos amino (-NH₂) del quitosano y los iones de calcio tipo I de la HAp, formando puentes de hidrógeno entre ellos. Aunque el análisis a través de las espectroscopias no demostró del todo la presencia de estas interacciones químicas, la buena adhesión entre las fases da evidencia de su existencia. La superficie de las partículas y las fibras de HAp son muy lisas y la adhesión química debe ser la más dominante.

5.5 Pruebas Mecánicas

Las pruebas de tensión hechas a las películas, tanto las de HAp comercial como las de nanofibras de HAp, arrojaron resultados muy reveladores sobre la resistencia mecánica de los materiales.

En la figura 5.17 se muestran las gráficas de esfuerzo vs deformación típicas de las mezclas con HAp comercial y la quitina sola. La gráfica muestra lo amplio de las regiones elástica y plástica del quitosano, lo que lo hace un material altamente deformable. Al incluir la HAp comercial a las películas de quitosano, se observa como se redujo significativamente, la capacidad de deformación del quitosano, al formarse materiales compuestos muy frágiles y quebradizos, cuya resistencia no logro rebasar el límite elástico; es decir, no mostraron una región plástica.

La mezcla con 5% de HAp mostró una menor resistencia al esfuerzo aplicado, que aquella mostrada por el quitosano puro. Por su parte, las películas con 10 y 20% de HAp si mostraron una mayor resistencia en la región elástica, pero no revelaron deformación plástica.

En general, podemos mencionar que este tipo de materiales, no son adecuados mecánicamente para ser utilizados como material de reemplazo óseo.

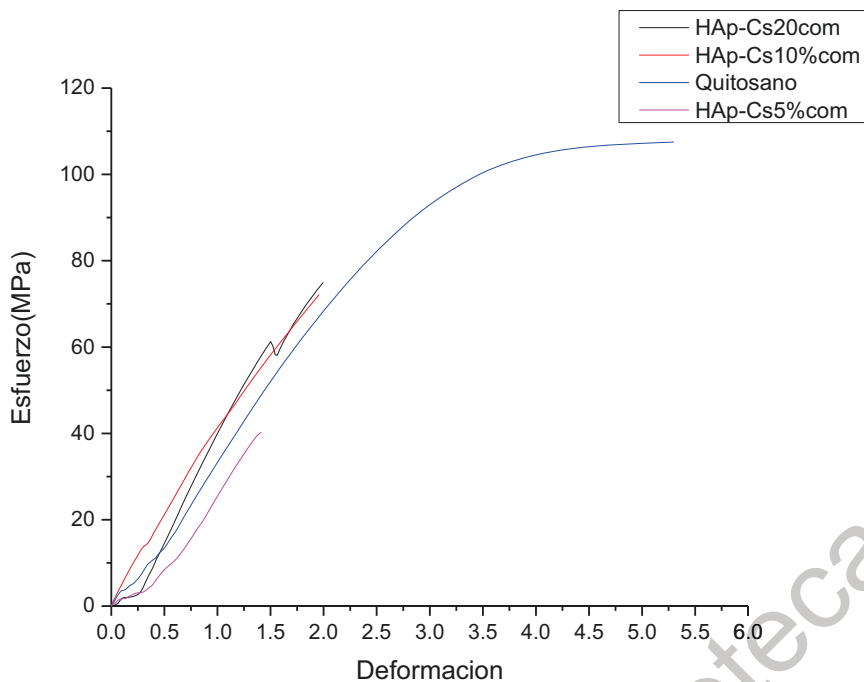


Figura 5.17 Gráficas de esfuerzo vs deformación en tensión para las películas de quitosano puro y conteniendo diferentes concentraciones de HAp comercial.

Para el caso de las películas conteniendo nanofibras de HAp, los resultados de la resistencia mecánica en tensión fueron muy diferentes respecto a los mostrados por las películas con HAp comercial. En la figura 5.18 se muestran las gráficas de esfuerzo vs deformación bajo tensión típicas para las películas con nanofibras de HAp. Al agregar 5 % en peso de las nanofibras de HAp, fue notorio un decremento inicial de la resistencia a la tensión de este material con respecto a la quitina pura, aunque es apreciable un aumento en el módulo de Young elástico. También es observable que la capacidad de deformación del material es similar a la de la quitina.

Al incrementar la concentración de nanofibras de HAp en la película al 10%, se observó un incremento notorio en la resistencia del material compuesto, aumentando tanto el módulo de Young elástico como el esfuerzo máximo respecto al observado en la quitina. Al aumentar el contenido de HAp en la película y llevarlo hasta un 20% en peso, se logró un incremento sustancial en la resistencia a la tensión del material compuesto. Como se puede observar en las gráficas de la figura 5.18, el módulo de Young y el esfuerzo máximo se incrementaron radicalmente,

pero al igual que para el caso de la película con 10% en peso de nanofibras, se encontró un acortamiento en la capacidad de deformación de estos materiales en la región plástica.

Este incremento en la resistencia mecánica de los materiales compuestos con nanofibras de HAp, bien puede ser el producto, en parte, de la resistencia mecánica que aportaron las nanofibras debido a su morfología, calidad cristalina y orientación preferencial en la [100]; además, la interacción química entre los componentes de la mezcla y la buena adhesión observada al SEM entre la película y las nanoestructuras de la HAp, pudieron ser factores que también contribuyeron a la resistencia mecánica final de los materiales compuestos.

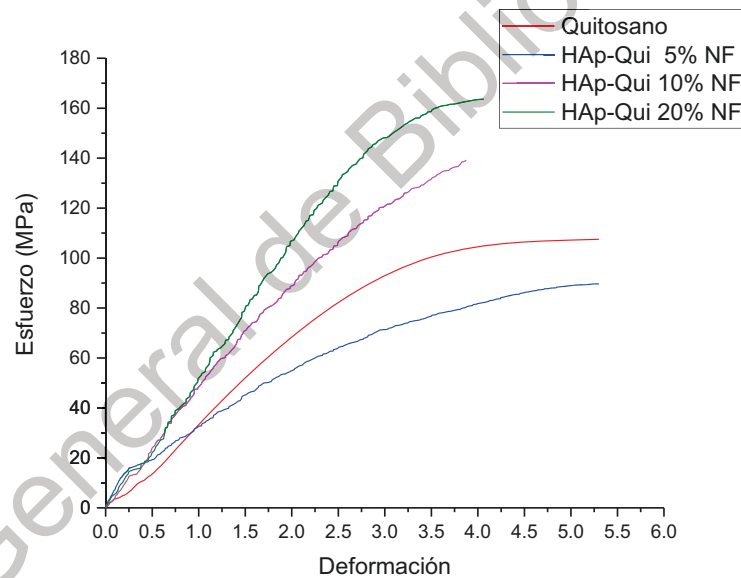


Figura 5.18 Graficas de esfuerzo vs deformación bajo tensión de las películas de quitosano pura y con diferentes contenidos de nanofibras de HAp.

Tabla 1. Módulo de Young Elástico y Esfuerzo Máximo para los diferentes materiales compuestos.

Muestra	Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo Máximo (MPa)
5%com	21.1927	40.316
10%com	42.5532	71.5969
20%com	43.2241	74.6025
5%sin	23.7201	89.664
10%com	43.611	138.881
20%com	54.345	163.603
Quitosano	35.6892	107.5055

En la tabla 1 se muestran los valores promedio de módulo de Young elástico y esfuerzo máximo para las películas de quitosano conteniendo diferentes concentraciones de HAp, tanto comercial como de nanofibras. En ambos tipos de materiales (con HAp comercial o con nanofibras) es clara la tendencia a aumentar su resistencia mecánica con el incremento en la concentración de HAp. Para el caso de las mezclas con HAp comercial, el aumento en el módulo de Young y el esfuerzo máximo fue notorio al pasar de 5 a 10% de contenido de HAp, pero al incrementar la concentración hasta un 20 % los incrementos fueron pequeños.

En los materiales con nanofibras de HAp, se encontró un incremento de menor magnitud en el módulo de Young al pasar de 5 a 10% en la concentración de nanofibras, respecto a lo encontrado para las mezclas con HAp comercial, pero el incremento en el esfuerzo máximo fue mayor. Al aumentar la concentración de HAp hasta un 20% en peso, el incremento en ambas variables mecánicas fue mayor al mostrado por su contraparte con HAp comercial.

Finalmente, podemos deducir de los datos de la tabla, que los materiales compuestos hechos con nanofibras de HAp, mostraron una resistencia mecánica superior a la lograda en los materiales hechos con HAp comercial.

6 CONCLUSIONES

Se logró la síntesis de las películas de quitosano con HAp. El uso del sonotrodo fue fundamental para lograr una dispersión homogénea de la HAp dentro de la matriz de la película.

Los materiales compuestos con nanofibras de HAp mostraron una mayor resistencia mecánica a la tensión en comparación con sus similares elaborados con HAp comercial. Esta mayor resistencia puede ser el producto de la interacción química entre los componentes de la mezcla, en particular entre los grupos amino del quitosano y los calcio tipo I de la HAp; asimismo, la morfología de fibra, la calidad cristalina y la orientación preferencial presente en las nanofibras de HAp fueron factores que también contribuyeron a lograr una mayor resistencia mecánica. Estos materiales compuestos con nanofibras de HAp, debido a su resistencia mecánica y a su homogeneidad, son buenos candidatos para ser utilizados como materiales de reemplazo óseo, y funcionar como un andamiaje que permita la regeneración natural del tejido óseo.

7 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 microstructures, 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., Kanngießner, 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*, nº 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. Hydroxiapatites 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., Rouquerol, 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

1.1 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)

7.1. 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

7.2. 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).

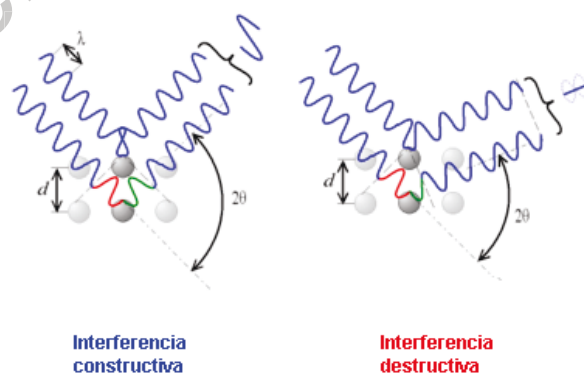


Figura 7.4 Ley de Bragg

7.3. Principios del análisis por EDS

- El detector genera un pulso de carga proporcional a la energía del rayo X.
- Este pulso se convierte en voltaje.
- 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
- La señal digitalizada se almacena en un canal asignado a esa energía en el analizador multicanal.

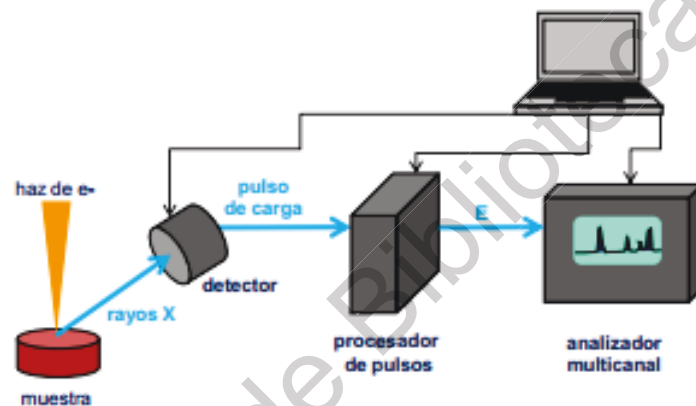


Figura 7.5 Diagrama de análisis por EDS

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

7.4. Principio físico de la fluorescencia de rayos X

Al exponer un material a rayos X de longitudes de onda cortas o a rayos gamma, 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 gamma 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.

7.5. 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.

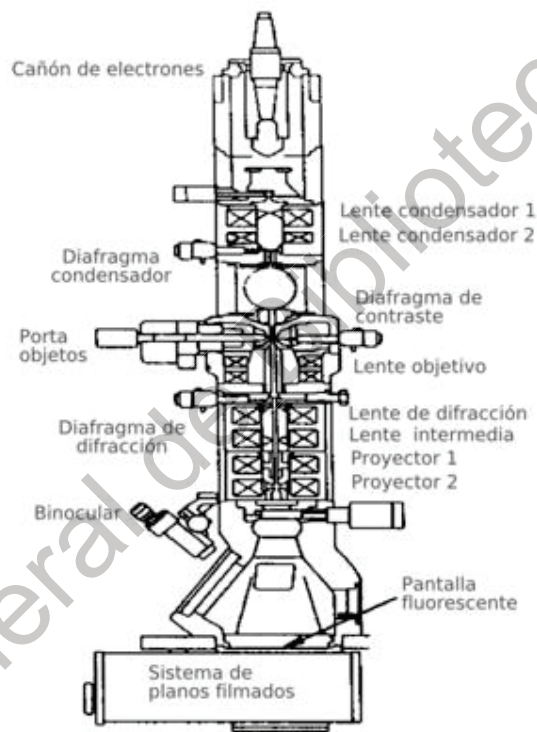


Figura 7.6 Esquema de un microscopio electrónico de transmisión

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.